

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA LYSOGÉNISATION DE *SALMONELLA TYPHI-MURIUM* (*)

par ANDRÉ LWOFF, ALBERT S. KAPLAN (**) et ÉVELYNE RITZ.

[*Service de Physiologie microbienne de l'Institut Pasteur* (***).]

INTRODUCTION.

L'étude de la lysogénisation de *Salmonella typhi-murium*, qui sera désignée par le symbole *S. t. m.*, a révélé à J. S. K. Boyd [4] que la proportion des bactéries survivant à l'infection par les phages tempérés du groupe A augmente avec la multiplicité. Cette conclusion est fondée sur des expériences de deux types : a) observation de culture en milieu liquide, b) numération des colonies sur des plaques de gélose imprégnées avec des quantités variables de phage.

Rappelons que les systèmes bactérie + phage tempéré peuvent, après infection, évoluer de plusieurs façons (voir [2, 3]).

1° Le phage entre dans la phase végétative et se développe. Des bactériophages sont produits et libérés par la lyse bactérienne. L'infection a été *productive*.

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du *National Cancer Institute of the National Institutes of Health* des Etats-Unis d'Amérique.

(**) Titulaire d'une bourse de la *National Foundation for Infantile Paralysis*.

(***) Manuscrit reçu le 16 juillet 1953.

2° Le phage est réduit en prophage. La bactérie survit sous forme de bactérie lysogène. L'infection a été *réductive*.

3° Le matériel génétique du phage disparaît. L'infection a été *abortive*, la bactérie pouvant ou non survivre.

Il s'agissait de savoir si la réponse de *Salmonella typhimurium* au phage tempéré dépendait bien de la multiplicité et si d'autres facteurs ne seraient pas capables de la modifier. Nos principaux résultats ont été exposés dans une note préliminaire [4]. Nous donnons ici le détail de nos expériences.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

SOUCHES. — Nous avons utilisé la souche lysogène 1404 (Al) de Boyd perpétuant le prophage Al qui sera désigné par A. Les phages A2 et A3 dont les propriétés sont, d'après Boyd [4], voisines de celles de Al n'ont pas été étudiés. Les souches détectrices 1404 ou 1411 de Boyd, *smooth*, donnent des variants *rough*, non réceptifs, dont la proportion augmente notablement dans certains milieux. Leur présence peut être gênante lorsqu'il s'agit de déterminer le pourcentage des divers types de réponses bactériennes. Seules des cultures isolées depuis moins de quarante-huit heures, à partir d'une colonie S, ont été mises en œuvre. Dans ces conditions, la fraction des formes R est inférieure à 10^{-4} .

MILIEUX. — A. *Bouillon*. — « Difco broth » 8 g, eau bidistillée 1 l. Le milieu est parfois enrichi en Mg^{++} et en Ca^{++} ($2 M \times 10^{-4}$).

B. *Milieu synthétique*. — PO_4H_2K 3,4 g, $SO_4(NH_4)_2$ 0,5 g, $SO_4Mg + 7H_2O$ 0,05 g, $(NO_3)_2Ca$ 0,0025 g, $SO_4Fe + H_2O$ 0,0001 g, eau bidistillée 1 l. KOH pour pH 7,4. On ajoute, après stérilisation : a) 1 cm³ d'une solution contenant les éléments à la concentration suivante : Cl_3Fe M/850, Cl_2CO M/41.000, SO_4Zn M/12.800, Cl_2Mn M/12.400, $(CH_3COO)_2Cu$ M/50.000 ; b) glucose q. s. pour 3 g/l.

C. *Milieux solides*. — Gélose pour la couche inférieure des boîtes de Petri : macération de viande peptonée (peptone Uclaf à 10 g/l) gélosée à 10 g/l.

Pour la couche supérieure qui contiendra les bactéries détectrices et le phage, le bouillon peptoné est gélosé à 7 g/l.

D. *Milieux pré-utilisés*. — Certains milieux, tout spécialement les milieux synthétiques, peuvent exercer parfois une action bactéricide lorsque des germes y sont introduits à dilution élevée. Pour toutes les expériences où interviennent des dilutions, nous avons employé des milieux préutilisés qui sont dépourvus d'action bactéricide.

a) Le bouillon ensemencé est prélevé lorsque la concentration des bactéries atteint $4 \times 10^7/\text{cm}^3$. On centrifuge et on stérilise le liquide surnageant vingt minutes à 115° .

b) Le milieu synthétique est additionné de glucose en concentration telle que tout l'aliment carboné est utilisé lorsque la concentration des bactéries atteint $4 \times 10^7/\text{cm}^3$. Le milieu est alors centrifugé et le liquide surnageant chauffé vingt minutes à 115° . Ce milieu sera ou non, suivant les cas, additionné de glucose.

BACTÉRIOPHAGES ET BACTÉRIES. — *Le bactériophage A.* — Les plages troubles formées sur la souche indicatrice ont été décrites et figurées par Boyd. Nous n'avons rien à reprendre à sa description, mais voudrions simplement remarquer que la dimension d'environ 2 mm, indiquée par Boyd, varie en fait de 0,5 mm à 8 mm suivant les conditions et les milieux.

Les bactériophages A sont adsorbés sur les bactéries détectrices avec sensiblement la même vitesse que le phage T2 sur *E. coli* B. La constante K du phage A, à 37° en bouillon, est de $6,7 \times 10^{-9} \text{ cm}^3/\text{min}$. Dans les conditions de nos expériences, lorsque une suspension de bactéries contenant 5×10^7 germes/ cm^3 est exposée à une multiplicité de 10, 3 phages par bactérie sont adsorbés en une minute. Ceci veut dire que 95 p. 100 des bactéries sont infectées durant la première minute. La vitesse d'adsorption est la même en milieu synthétique et en bouillon. Dans un tampon de phosphate, pH 7,0, 10^{-4} M, la vitesse n'est pas modifiée de façon significative par KCl 10^{-1} M, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et MgSO_4 10^{-3} et 10^{-4} M, ni par l'oxalate de sodium 5×10^{-3} M.

Les souches détectrices *smooth* adsorbent également le phage A qu'elles aient été cultivées en milieu synthétique ou en bouillon et qu'elles soient mises en œuvre au début, au milieu, ou à la fin de la phase exponentielle de croissance en bouillon.

Les premières particules infectieuses révélées par la méthode de Doerman au cyanure apparaissent dix-huit à vingt minutes après l'infection (à 37°). La libération spontanée commence vers la trentième ou trente-deuxième minute. Ces chiffres sont valables aussi bien pour ce qui concerne le milieu synthétique que le bouillon.

La souche lysogène S. t. m. (A). — Les bactéries lysogènes A, traitées par le sérum antiphage et étalées sur la souche détectrice, donnent en moyenne 1 plage pour 1 000 colonies.

La souche lysogène est inductible par la lumière ultraviolette. Les courbes du pourcentage des bactéries induites en fonction de la dose montrent : 1° une partie ascendante ; 2° un plateau ; 3° une partie descendante. Le plateau correspond à des doses d'U. V. donnant une survie bactérienne de 20 à 1 p. 100. Pour

ces doses, la proportion des bactéries donnant des phages varie de 15 à 30 p. 100 ; une fraction importante des bactéries ne donne donc pas de bactériophages. Douze souches lysogènes artificielles se sont comportées comme la souche originale.

Ajoutons que, si après l'irradiation, les bactéries sont traitées pendant dix minutes à pH 7,0, à 37°, par le 2-4-dinitrophénol $3,3 \times 10^{-3}$ M ou le nitrure de sodium 10^{-3} M, la fraction des bactéries produisant des bactériophages est doublée pour les doses d'U. V. correspondant au début du plateau (2-4-dinitrophénol) ou à la fin de ce plateau (nitrure). Les modifications du métabolisme apportées par certains inhibiteurs permettent donc à des bactéries irradiées de conduire le développement du phage à son terme.

Le bactériophage Ac. — Le phage original Al⁺, que nous appellerons A, issu de la souche lysogène *S. t. m.* (A) donne des plages troubles. Une plage claire apparaît de temps à autre parmi celles-ci. Le phage isolé de ces plages claires a été appelé Ac [6]. Le caractère des plages est certainement lié au fait que le « quotient de lysogénisation » du phage Ac est faible, 10^{-3} environ, au lieu de 5×10^{-1} environ pour le phage A. (Le quotient de lysogénisation est la fraction des bactéries infectées dans des conditions données qui deviennent lysogènes.) Enfin, la réponse bactérienne au phage Ac n'est pas influencée par la multiplicité, contrairement à ce qui se passe pour le phage A. Par tous les autres caractères étudiés, constante d'adsorption, période latente, sensibilité au sérum anti-phage A, le phage Ac se comporte comme le phage A original. Ajoutons que les souches lysogènes *S. t. m.* (Ac) sont inductibles et libèrent exclusivement le phage Ac. Les bactéries lysogènes A sont immunes vis-à-vis du phage Ac.

Des bactéries infectées par A, puis par Ac après dix minutes, donnent des lysogènes A. La surinfection par le phage Ac ne permet évidemment la survie que des seules bactéries immunes, c'est-à-dire lysogènes A, et constitue ainsi un test effectif de la réponse bactérienne au phage A. La proportion des bactéries lysogénisées par Ac, 10^{-3} environ, est négligeable dans les conditions de nos expériences. Nous ne savons pas encore si une bactérie à deux noyaux dont un seul porte un prophage A est ou non immune contre le mutant Ac.

MESURE DE LA LYSOGÉNISATION. — Lorsque des bactéries détectrices sont infectées par le phage A (multiplicité 20), puis traitées pendant quinze minutes à 37° par un sérum anti-phage A ($k=300$) à 1 p. 100, on constate que toutes les colonies (100 sur 100) sont constituées par des bactéries lysogènes. Dans les conditions de nos expériences, il n'y a pas, ou très peu, d'infections

abortives. Les bactéries infectées, ou bien produisent du phage, ou bien sont lysogénisées et survivent : l'infection est soit productive, soit réductive.

Pour l'étude de la réaction bactérienne à l'infection, plusieurs techniques ont été utilisées :

1° Etude de la densité optique des suspensions. La culture est agitée au bain-marie à 37° et des mesures effectuées toutes les dix minutes.

2° Détermination du nombre de centres infectieux. Après traitement par le sérum anti-phage A, le rapport nombre de centres infectieux/nombre de bactéries infectées donne la fraction des réponses productives, et par différence celle des réponses réductives. Si la multiplicité est faible, inférieure à 0,1, c'est le rapport nombre de centres infectieux/nombre de phages adsorbés qui donne la fraction des réponses productives.

3° Détermination de la fraction des bactéries survivantes. Cette fraction peut être déterminée directement pour les multiplicités élevées supérieures à 4.

Mais la somme des bactéries survivantes et des centres infectieux est cependant supérieure au total des « bactéries » mises en œuvre. Ce phénomène peut être interprété de la manière suivante. L'examen des cultures de *S. t. m.* révèle la présence de nombreux diplobacilles. Supposons qu'un diplobacille soit infecté par un phage A. Si l'infection est réductive, on aura une colonie mixte formée de bactéries lysogènes et de bactéries sensibles. Si l'infection est productive, il y a beaucoup de chances pour que la bactérie non infectée subisse une infection massive après lyse de sa voisine et donne naissance à un clone lysogène. Un diplobacille infecté par un phage A peut donc donner naissance à une colonie lysogène, même si l'infection a été productive. La préférence pour la mesure de la lysogénisation par le phage A a donc été donnée à une technique donnant le pourcentage des bactéries infectées par A et immunes contre le phage Ac. Les bactéries infectées par le phage A sont, après dix minutes d'agitation à 37°, additionnées de phage Ac, à multiplicité 10 environ. Seules survivent à l'infection par le phage Ac les bactéries qui ont été lysogénisées par A. Sauf indication contraire, seules des bactéries en voie de croissance exponentielle ont été mises en œuvre. En général, les cultures utilisées renferment environ 5×10^7 bactéries/cm³.

LA RÉPONSE BACTÉRIENNE EN FONCTION DE LA MULTIPLICITÉ.

Les expériences de Boyd ont été réalisées dans des tubes non aérés et les mesures de densité optique ont été effectuées toutes les trente minutes. La période latente du phage A, dans des

cultures aérées est de trente-deux minutes ; elle pourrait être plus importante dans les conditions de semi-anaérobiose. Nous avons repris ce type d'expérience dans des conditions plus précises (voir fig. 1). On voit que l'allure des courbes dépend de la multiplicité et que la lyse est plus importante pour les multiplicités faibles à la condition que la multiplicité ne soit pas notablement inférieure à 1. En effet, lorsque le nombre de bactéries qui se lysent au premier cycle est négligeable, ce sont les cultures infectées avec une multiplicité initiale 0,01 qui se

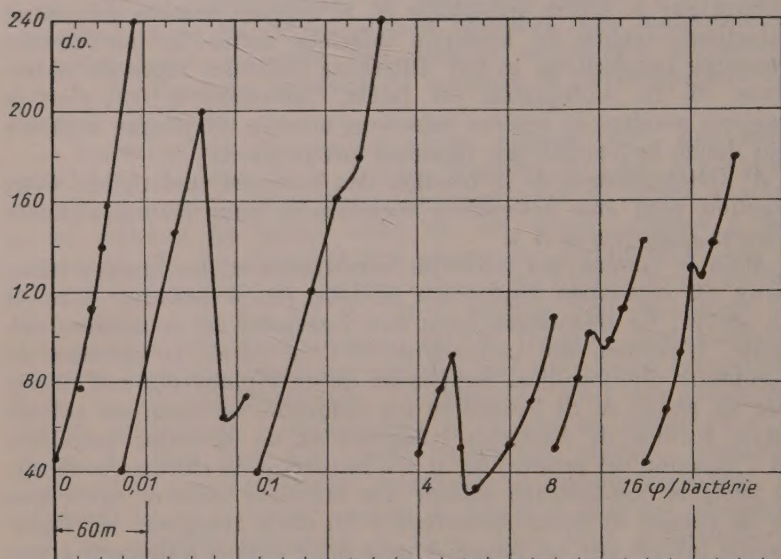


FIG. 1. — La réponse bactérienne en fonction de la multiplicité.

En abscisse le temps ; en ordonnée la densité optique exprimée en graduations de l'électrophotomètre de Meunier. La graduation 100 correspond ici à 10^8 bact/cm³. Des bactéries en voie de croissance exponentielle en bouillon sont infectées à temps 0. Les cultures sont agitées dans un bain-marie à 37°. On voit que, pour la multiplicité 0,01, il y a eu lyse importante entre la soixantième et la soixante-dixième minute, alors que la lyse est faible pour la multiplicité 0,1. Pour la multiplicité 4, il y a lyse importante entre la trentième et la quarantième minute, lyse faible pour les multiplicités 8 et 16.

Pour les multiplicités inférieures à 1, la lyse coïncide avec le second cycle du développement et correspond vraisemblablement, dans le premier cas (multiplicité initiale 0,01) à une multiplicité « secondaire » de 3, dans le deuxième (multiplicité initiale 0,1), à une multiplicité secondaire de 30.

lysent, alors que celles où la multiplicité initiale est 0,1 ne se lysent pas. Le sort des bactéries dépend alors manifestement du rapport phage/bactérie après le premier cycle de développement du phage.

L'examen de la figure 2 montre l'existence d'une relation entre la multiplicité et le type de la réponse bactérienne. Il montre aussi qu'à multiplicité égale le pourcentage de réponses réductives est moins élevé en milieu synthétique qu'en bouillon. Ainsi s'est imposée la conclusion que la réponse bactérienne dépend non seulement de la constitution génétique de la bactérie et du phage et de la multiplicité de l'infection, mais aussi de facteurs phénotypiques. On va voir que la réponse bactérienne peut être modifiée par une série d'agents chimiques ou physiques.

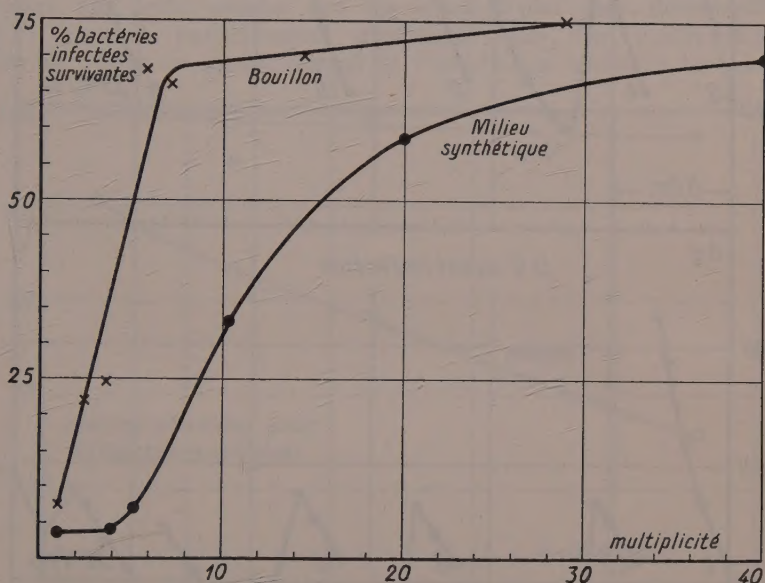


FIG. 2. — La réponse bactérienne en fonction de la multiplicité.

Des bactéries en voie de croissance exponentielle en bouillon ou en milieu synthétique sont additionnées de phage A (la multiplicité est indiquée en abscisse) et les cultures agitées à 37°. Après dix minutes, on ajoute 15 phages Ac par bactérie et on étale après cinq minutes.

Pour déterminer le nombre de réponses réductives correspondant à une multiplicité réelle de 1, on ajoute 0,1 phage par bactérie. Dans ces conditions, la proportion des bactéries infectées qui n'ont reçu qu'un seul phage est voisine de 95 p. 100.

INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LA RÉPONSE BACTÉRIENNE.

Toute une série de facteurs ou d'agents augmentent la probabilité de la réponse productive. Nous les passerons rapidement en revue. Si des bactéries infectées avec une multiplicité 8, laissant 70 p. 100 de bactéries survivantes, sont portées à 42°

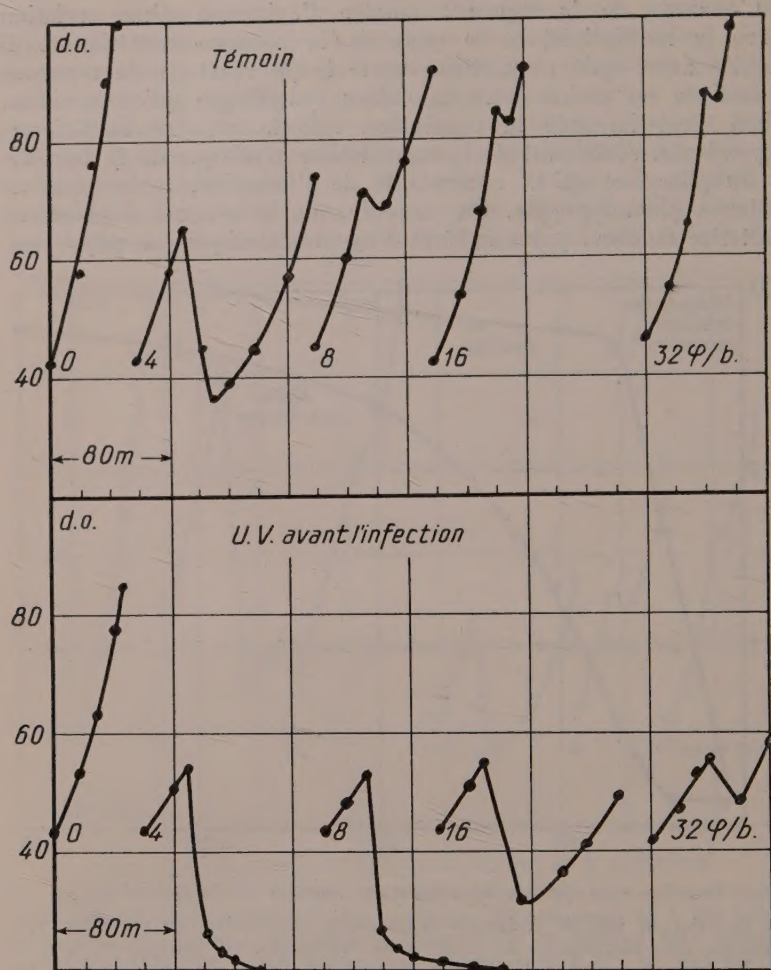


FIG. 3. — Influence d'une irradiation préalable de bactéries détectrices sur la réponse bactérienne à l'infection par le phage A.

La suspension bactérienne (culture en bouillon) est centrifugée, mise en suspension en milieu synthétique pré-utilisé et irradiée à l'U. V. Puis les bactéries sont mises en suspension en bouillon et infectées avec une multiplicité variée de phage A.

En ordonnée, la densité optique exprimée en graduations de l'électrophotomètre de Meunier. On voit que la réponse productive, se traduisant par la lyse, est beaucoup plus importante chez les bactéries irradiées que chez le témoin (multiplicité 4 et 8). On voit aussi que les multiplicités élevées, 16 et 32, compensent partiellement l'effet de l'irradiation. Dans cette expérience, l'U. V. a tué 37 p. 100 des bactéries.

aussitôt après l'infection, on constate que la proportion de bactéries qui se lysent augmente avec la durée du séjour à température élevée. Le pourcentage des survivantes est de 2 p. 100 après un séjour de dix minutes à 42°.

Si la souche détectrice est irradiée par des rayons ultra-violet, dose tuant 37 p. 100 de survivants, puis infectée, on constate que la réponse bactérienne est orientée vers la production de phages. La comparaison des courbes des parties supérieure et inférieure de la figure 3 est, à cet égard, fort suggestive. On notera sur cette courbe que les effets d'une dose déterminée d'U. V. sont partiellement compensés par des multiplicités élevées. Tout se passe comme si l'irradiation orientait les bac-

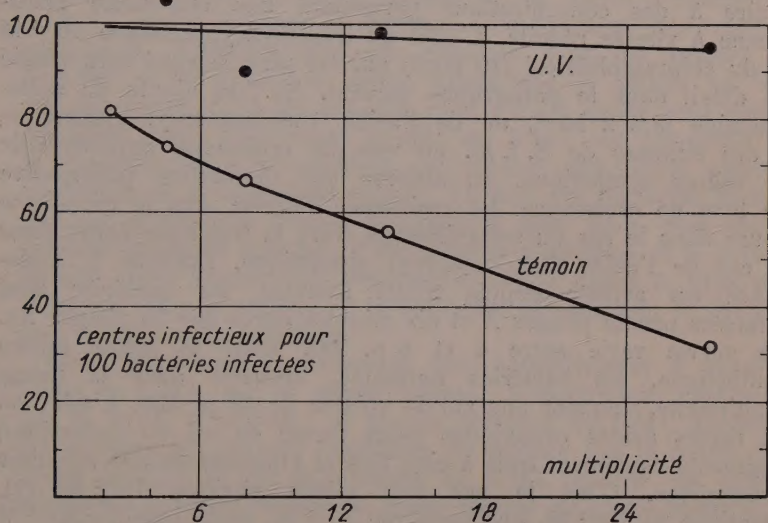


FIG. 4. — Influence de l'irradiation préalable sur le pourcentage des réponses productives.

Les suspensions bactériennes (cultures en bouillon) sont centrifugées, mises en suspension en milieu synthétique pré-utilisé. L'un des échantillons sert de témoin, l'autre est irradié (pourcentage des bactéries tuées : 71). Les suspensions sont ensuite suspendues en bouillon puis infectées avec des multiplicités diverses de phage A. On voit que le pourcentage des bactéries donnant des centres infectieux, c'est-à-dire des réponses productives, est beaucoup plus élevé pour les bactéries irradiées que pour les bactéries témoins. La multiplicité 27 donne plus de 90 p. 100 de centres infectieux chez les bactéries irradiées, contre 30 p. 100 chez le témoin.

téries vers l'état favorable à la réponse productive, alors que l'infection multiple les oriente vers la réponse réductive. Le résultat final dépendrait ainsi du rapport des effets en jeu. L'expérience représentée sur la figure 4 montre que pour une

dose d'U. V. tuant 71 p. 100 des bactéries, les bactéries infectées avec 27 phages A donnent plus de 90 p. 100 de réponses productives contre 30 p. 100 dans les bactéries témoins non irradiées.

Nombre de facteurs ou d'agents modifiant le métabolisme agissent comme l'irradiation. Si des bactéries infectées avec une multiplicité de 5 sont soumises à l'anaérobiose immédiatement après l'infection, la proportion des réponses productives passe de 50-60 p. 100 (témoin) à 10-15 p. 100. Nombre d'inhibiteurs étudiés dans les mêmes conditions agissent de la même façon. C'est le cas du cyanure $M \times 10^{-4}$ à $2 \times 10^{-5} M$, du nitrure $2 \times 10^{-3} M$, du 2-4-dinitrophénol $4 \times 10^{-4} M$, c'est-à-dire à des concentrations permettant une croissance bactérienne à vitesse réduite. L'effet du 5-méthyltryptophane $10^{-4} M$ et du chloramphénicol (10 mg/l) qui est plus marqué sera étudié en détail dans le paragraphe suivant. Si l'on ajoute du sulfanilamide ($8,5 \times 10^{-4}$) ou de l'acide 4-aminoptéroyl glutamique à des cultures de *S. t. m.* en voie de croissance exponentielle en milieu synthétique, on observe une diminution progressive du taux de croissance. La croissance s'arrête vers la cinquième heure dans le cas du sulfanilamide, vers la troisième heure dans le cas de l'acide 4-aminoptéroyl glutamique. Lorsque la croissance est arrêtée depuis trente minutes, les bactéries sont infectées par 25 phages A et dix minutes après par 10 phages Ac. La survie varie entre 4 et 6 p. 100. Dans le même milieu synthétique, les bactéries normales, infectées avec la même multiplicité, donnent une survie voisine de 60 p. 100. L'addition de divers acides organiques (sous forme de sel de potassium) augmente également trois à cinq fois le pourcentage des réponses productives. C'est le cas des acides citrique $10^{-2} M$ (1), l-malique $2 \times 10^{-2} M$, oxaloacétique $10^{-2} M$, malonique $2 \times 10^{-2} M$ à $3 \times 10^{-3} M$, pyruvique 2×10^{-2} à $10^{-2} M$, lactique $5 \times 10^{-2} M$, pyrophosphorique $3,3 \times 10^{-3} M$.

On notera que les acides mis en œuvre (sous la forme de sels de potassium) exercent, à concentration élevée, une action agglutinante intense. C'est le cas du citrate 10 à $2,5 \times 10^{-2} M$, du malonate $5 \times 10^{-2} M$, du l-malate $5 \times 10^{-2} M$, du fumarate $2,5 \times 10^{-2} M$, en présence desquels les bactéries en suspension sont immédiatement agglutinées en 2 à 3 gros grumeaux.

(1) Parry et Edwards [5] ont déterminé le nombre de bactéries qui survivent sur gélose peptonée et milieu de Koser au citrate contenant 10^8 q/cm³. Les chiffres sont respectivement 37 p. 100 et 19 p. 100. Mais l'on ignore la multiplicité d'infection, et si l'effet du milieu est dû à l'absence de peptone ou à la présence de citrate.

LA PÉRIODE CRITIQUE.

On sait depuis les travaux de S. S. Cohen et T. Anderson [6] que le 5-méthyltryptophanne (5 MT) bloque le développement du phage T2 et que son action est supprimée par le tryptophanne. On sait aussi que la période latente de T2 est augmentée d'une durée égale à celle de l'action du 5 MT. Il était intéressant d'examiner l'effet du 5 MT sur la réponse bactérienne au phage A.

Les expériences sont de deux types (voir le détail sur la légende de la figure 5). Dans le premier type, on infecte les bactéries et on ajoute du 5 MT à temps divers. Dans le deuxième, on infecte les bactéries en présence de 5 MT et on ajoute du tryptophanne à temps divers. L'examen de la figure 5 montre que le 5 MT ajouté à temps 0 diminue la proportion des réponses réductives. Ajoutons que les résultats sont les mêmes que le 5 MT ait été ajouté au même temps que le phage ou vingt minutes avant. Le 5 MT est sans effet s'il est ajouté neuf minutes ou plus après l'infection. L'effet du 5 MT est supprimé par le tryptophanne à la condition que celui-ci soit ajouté entre la quatrième et la cinquième minute. Le sort des bactéries infectées par une multiplicité donnée de phage A peut donc être modifié pendant quelques minutes. C'est entre la cinquième et la huitième minute, dans l'expérience représentée sur la figure 5, plus généralement entre la sixième et la neuvième minute, que se décide le sort des bactéries infectées.

Ces expériences conduisaient tout naturellement à examiner l'effet du 5 MT sur la phase latente. L'expérience représentée sur la figure 6 montre : a) que la présence du 5 MT durant les six minutes qui suivent l'infection ne modifie pas la durée de la phase latente ; b) que la présence de 5 MT durant les dix-huit premières minutes retarde la phase latente de douze minutes [6].

Les mêmes résultats ont été obtenus pour le mutant Ac. Il y a donc, dans le cycle végétatif des phages A et Ac, une période de six minutes qui suit immédiatement l'infection et qui est insensible à l'action du 5 MT.

L'existence d'une période critique est d'ailleurs révélée par d'autres agents. Des bactéries sensibles sont infectées en bouillon à 37° à temps 0 par 20 phages A et 8 phages Ac. A temps divers (t), la suspension est diluée à 10^{-2} en bouillon à 42°. L'étalement est effectué après dix minutes à 42° et on dénombre les bactéries survivantes.

t (minutes)	BACTÉRIES survivantes p. 100
3	1,6
6	2,5
8	49
10	47

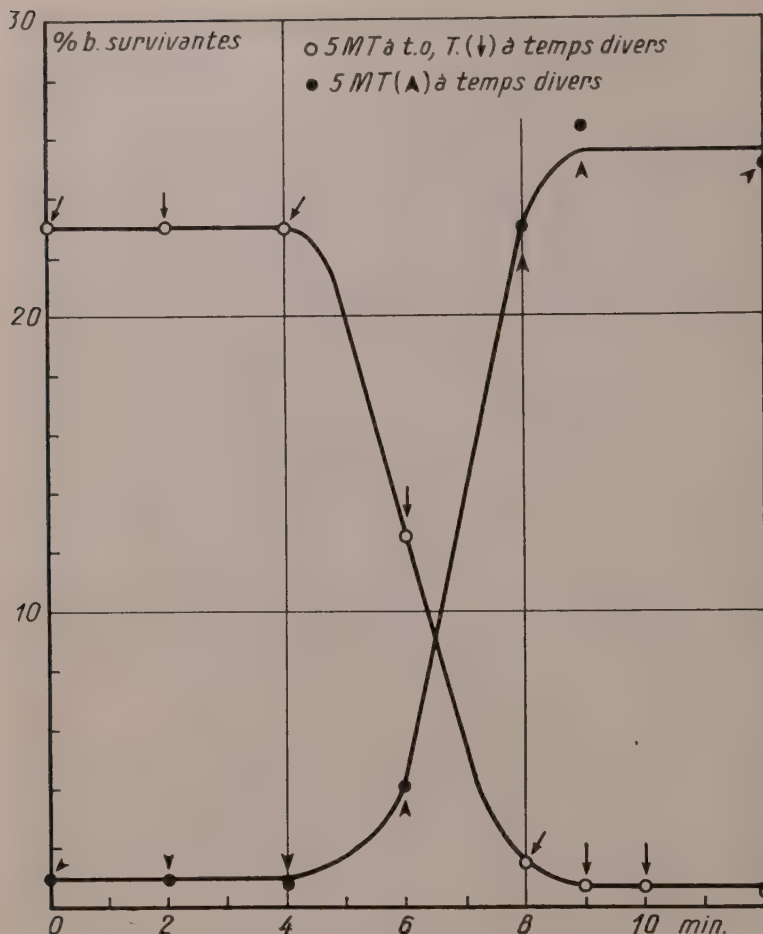


FIG 5. — Influence du 5-méthyl-tryptophanne (5MT) sur la réponse bactérienne.

Des bactéries en voie de croissance exponentielle en milieu synthétique sont infectées par le phage A (multiplicité 10) à temps 0.

Dans l'une des expériences, le 5 MT (pour une concentration finale de 10^{-4} M) est ajouté à temps divers. Le phage Ac (multiplicité 10) est ajouté cinq minutes après le 5 MT. On voit que le pourcentage des bactéries lysogénisées par A est 25 fois plus faible en présence de 5 MT que dans le témoin. Ceci toutefois à la condition que le 5 MT ait été ajouté au plus tard quatre à cinq minutes après l'infection. Le 5 MT ajouté après neuf minutes est sans effet.

Dans l'autre expérience, le 5 MT a été ajouté à temps 0 et le tryptophanne (T) 10^{-4} M ajouté à temps divers. On voit que l'effet du 5 MT est supprimé à condition que le tryptophanne soit ajouté avant la quatrième-cinquième minute. Le tryptophanne ajouté à la neuvième minute est sans effet.

Dans une seconde expérience du même type, le pourcentage de bactéries survivantes a oscillé entre 0,9 et 0,8 pour les bactéries portées à 42° entre la première et la cinquième minute et est passé à six, sept et huit minutes, respectivement à 1,7, 3,4 et 19. C'est donc bien entre la sixième et la huitième minute que le système devient insensible à un chauffage à 42°.

Le citrate ajouté à des bactéries infectées en bouillon depuis

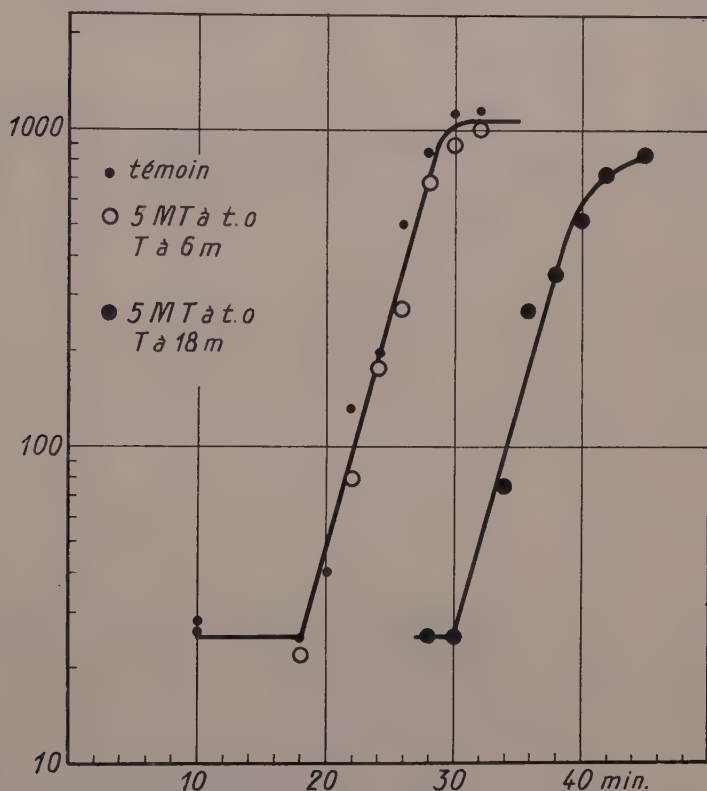


FIG. 6. — Influence du 5-méthyl-tryptophanne sur la phase latente du bactériophage A.

Une culture de bactéries détectrices en voie de croissance exponentielle en milieu synthétique est divisée en trois parties. L'une sert de témoin. L'autre sera additionnée de 5-méthyltryptophanne (5 MT) pour une concentration de 10^{-4} . Dix minutes après, temps 0 du graphique, on ajoute du phage A (1 phage par bactérie). Dans l'un des tubes, on ajoute du tryptophanne pour une concentration 10^{-4} M à temps 6, dans l'autre à temps 18. Les suspensions sont diluées à temps divers dans du KCN 10^{-2} M et après une heure à 37° on dénombre les centres infectieux. On voit que la courbe des particules infectieuses n'est pas modifiée si le tryptophanne a été ajouté à temps 6, et que cette courbe est décalée de douze minutes lorsque le tryptophanne a été ajouté à temps 18.

dix minutes est sans effet. Si, à des bactéries infectées en bouillon + citrate 10^{-3} M, on ajoute du sulfate de magnésium 2×10^{-3} M,

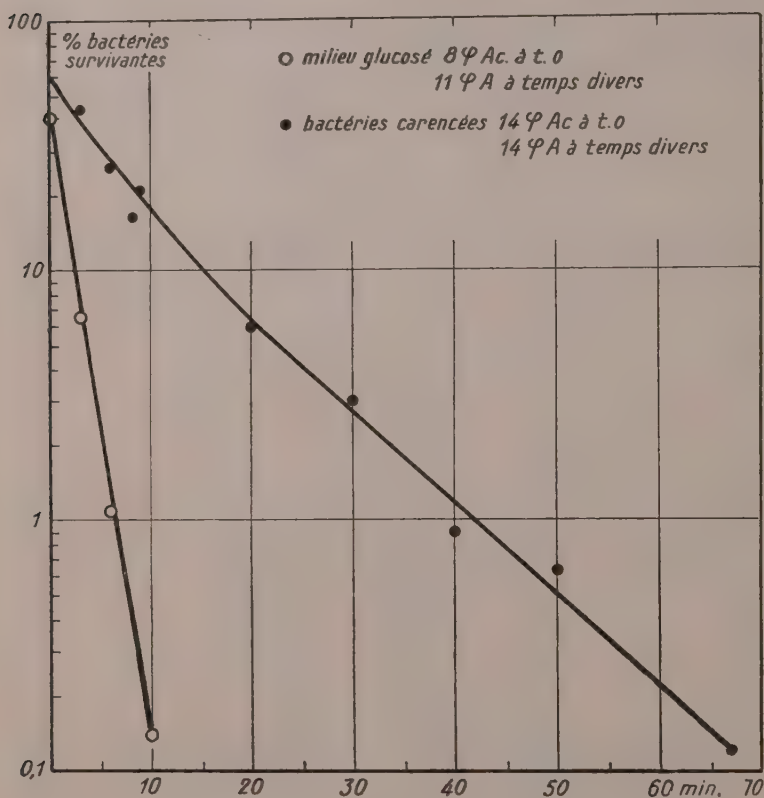


FIG. 7. — Influence de la carence en aliment carboné sur l'évolution du bactériophage Ac.

Deux expériences sont représentées sur cette figure. Dans la première, les bactéries en voie de croissance exponentielle en milieu synthétique glucosé ont été infectées à temps 0 par 8 phages Ac. 11 phages A ont été ajoutés à temps divers et l'étalement a été effectué dix minutes après l'addition du phage A. On voit que le pourcentage des bactéries qui peuvent être sauvées par le phage A diminue rapidement, atteignant environ 0,1 vers la dixième minute. Dans la deuxième expérience, les bactéries ont été cultivées dans un milieu synthétique où la concentration en glucose était calculée de façon à obtenir une croissance correspondant à 5×10^7 bact/cm³. La courbe de croissance a été suivie et les bactéries ont été mises en œuvre une heure trente après l'arrêt de la croissance. A ce moment, on ajoute du phage Ac, puis du phage A à temps divers. Les préparations de phage étaient purifiées par centrifugation et par épuisement par contact avec des *S. t. m.* rough qui absorbent les traces d'aliments. La comparaison des deux courbes correspondant à des bactéries alimentées en glucose d'une part, carencées d'autre part, est très suggestive.

TABLEAU I.

Des bactéries en voie de croissance en milieu synthétique sont additionnées de ϕ A, de ϕ Ac ou successivement de ϕ Ac, puis de ϕ A. Dans les colonnes correspondant aux phages, les chiffres indiquent le temps en minutes (temps 0, temps 3, etc.) de l'addition des phages. On voit que le pourcentage des bactéries infectées par le phage Ac qui peuvent être sauvées par le phage A décroît rapidement dans le témoin. Dans la culture additionnée de chloramphénicol, on note : 1° que le pourcentage des bactéries survivantes est diminué par un facteur 6 environ ; 2° que ce pourcentage ne décroît pas sensiblement en quarante minutes.

Témoin			Chloramphénicol 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$		
ϕ Ac à t	ϕ A à t	% de bactéries survivantes	ϕ Ac à t	ϕ A à t	% de bactéries survivantes
-	0	39	-	0	6,3
0	-	0,14	0	-	0,12
0	0	41	0	0	3,8
0	3	6	0	6	3,7
0	6	1,2	0	20	2,5
0	9	0,16	0	40	2,3

on constate que les effets du citrate ne sont supprimés que si le magnésium est ajouté avant la sixième minute.

La durée de la période critique peut d'ailleurs être augmentée. L'examen de la figure 7 montre que les bactéries infectées par le phage Ac peuvent être sauvées par surinfection par le phage A pendant une période beaucoup plus longue si elles sont carencées en aliment carboné que si elles disposent de glucose. Nous reviendrons sur l'interprétation de ce résultat.

L'expérience résumée sur le tableau 1 montre que le chloramphénicol diminue le pourcentage des bactéries lysogénisées par le phage A. Elle montre aussi qu'en présence de chloramphénicol les bactéries infectées par le phage Ac peuvent être sauvées par le phage A pendant au moins quarante minutes.

Tout se passe donc comme si, dans les conditions normales à 37°, une réaction irréversible conduisant, soit vers la phase végétative, réponse productive, soit vers la lysogénisation, réponse réductive, avait lieu entre la sixième et la neuvième minute qui suit l'infection.

DISCUSSION.

D'après les conceptions de Boyd, les suspensions de phage A seraient un mélange de deux types de phages, l'un possédant le pouvoir de lysogéniser, soit $l +$, l'autre non, soit $l -$. Seules les bactéries recevant une particule $l +$ donneraient une réponse réductive. Le prophage $l +$ correspondant se développerait uniquement lorsqu'il muterait vers $l -$. Et la particule $l -$ donnerait des mutants $l +$. Comme 1 bactérie sur 10 infectée par un seul phage A est lysogénisée, cela voudrait dire que le rapport $l +/l -$ est de 1/9. Cela voudrait dire aussi que tout phage $l -$ donnerait 10 p. 100 de mutants $l +$, cependant que la probabilité de la mutation spontanée $l + \rightarrow l -$ du prophage, c'est-à-dire la probabilité pour qu'une bactérie lysogène donne du phage dans l'intervalle de deux divisions, est de l'ordre de 10^{-4} . Si le développement du prophage était lié à une mutation spécifique, il faudrait admettre aussi que l'U. V. induit cette mutation avec une probabilité de 0,5. On voit quelle cascade d'hypothèses entraîne la théorie de Boyd.

Une mutation du phage, telle la mutation $\Lambda \rightarrow \text{Ac}$, peut modifier le quotient de lysogénisation pour une bactérie déterminée : il est donc évident que la constitution génétique du phage peut intervenir dans le déterminisme de la réponse bactérienne. La constitution génétique de la bactérie peut intervenir aussi dans cette réponse. Nous n'insisterons pas sur ces questions qui ont été discutées par ailleurs [3]. Cependant, le fait que le sort de *S. t. m.* infectée par le phage A puisse être modifié par l'action de divers agents prouve, en tous cas, que la constitution génétique du phage et de la bactérie ne sont pas les seuls facteurs en jeu dans la réponse bactérienne.

Nos expériences démontrent que lorsque la multiplicité de l'infection de *Salmonella typhi-murium* par le phage A augmente, le pourcentage des réponses réductives augmente : il y a moins de centres infectieux et, corrélativement, plus de bactéries infectées survivent. L'étude de la réponse bactérienne montre que 5 à 10 p. 100 environ des bactéries infectées par un seul bactériophage A survivent à la surinfection par le mutant Ac. La relation entre la multiplicité et la nature de la réponse bactérienne est différente en milieu synthétique et en bouillon. Et l'addition au bouillon de nombreux acides organiques, d'inhibiteurs divers, l'anaérobiose, le chauffage des bactéries pendant dix minutes à 42° , une irradiation aux rayons ultraviolets avant l'infection, augmentent la proportion des réponses productives.

La présence du prophage A immunise la bactérie lysogène A contre le mutant Ac. Des bactéries infectées simultanément par le phage A (à multiplicité élevée) et Ac se comportent comme des

bactéries infectées par le phage A seul. Enfin : a) les agents physiques (chauffage à 42°) ou chimiques (citrate, 5-méthyltryptophanne) ne modifient la réponse bactérienne que pour autant qu'ils interviennent moins de six minutes après l'infection ; b) le tryptophanne ne reverse l'action du 5-méthyltryptophanne que pour autant qu'il agisse avant la sixième minute ; c) au cours du cycle végétatif, les six minutes qui suivent l'infection, c'est-à-dire les six premières minutes de la période latente, sont insensibles à l'action inhibitrice du 5-méthyltryptophanne alors que la période suivante est sensible ; d) le jeûne carboné et le chloramphénicol prolongent considérablement la période durant laquelle une bactérie infectée par le phage Ac peut être sauvée par surinfection par le phage A.

Quel est le mécanisme de l'effet de la multiplicité de l'infection ? Rappelons d'abord que l'effet de la multiplicité est, jusqu'ici, propre à *Salmonella typhi-murium* et au phage A. Il a été recherché sans succès chez *Escherichia coli* λ par M. Lieb [7], chez *Pseudomonas pyocyanea* par F. Jacob [8]. Revenons au cas de *Salmonella typhi-murium*. Une infection multiple pourrait agir de deux façons ; 1° en diminuant la vitesse de l'évolution vers le gonophage, par exemple par compétition de nombreux germes pour un même site fonctionnel ; 2° en favorisant l'évolution vers le prophage, soit en agissant sur la vitesse d'une réaction, soit en augmentant la probabilité d'une rencontre entre germe et récepteur spécifique.

Rappelons que l'U. V. favorise la réponse productive, mais que l'effet d'une faible dose peut être compensé partiellement par une multiplicité élevée. De même, l'effet du milieu synthétique, moins favorable que le bouillon à la réponse réductive, est lui aussi compensé par une multiplicité élevée. Tout se passe donc comme s'il existait un état bactérien que divers agents d'une part, une infection multiple d'autre part, modifieraient dans un sens favorable à l'une ou l'autre évolution du germe : productive ou réductive.

L'ensemble des données est interprété de la façon suivante. Le matériel génétique du phage A, ou germe, est injecté dans la bactérie. Il peut évoluer de deux façons : ou bien il sera converti en *gonophage*, qui est l'état du matériel génétique du phage, durant la phase végétative et le phage se développera ; c'est la réponse productive. Ou bien il sera réduit en *prophage* et la bactérie sera lysogénisée, c'est la réponse *réductive*. La probabilité pour que l'une ou l'autre éventualité se réalise dépend de propriétés bactériennes telles qu'elles sont modifiées par divers agents et par la multiplicité. Lorsqu'il s'agit d'une infection mixte A + Ac, le sort de la bactérie dépendra du fait que le germe A sera réduit en *prophage* A avant que la réaction irré-

versible germe *Ac* \rightarrow gonophage *Ac* ait eu lieu. On se souvient que cette réaction est retardée par le jeûne carboné et le chloramphénicol, et n'est pas empêchée par le 5-méthyltryptophanne.

Dans une bactérie infectée, un phénomène irréversible a lieu entre la sixième et la neuvième minute qui suit l'infection, phénomène qui commande le sort du germe du phage infectant et par là même, celui de la bactérie. Pour la commodité de la discussion, nous avons considéré que le phénomène était une modification du germe du phage, modification dont l'existence ne fait pas de doute lorsque l'on considère la séquence germe \rightarrow prophage ; les propriétés du prophage sont, en effet, fort différentes de celles du germe. Cependant, le phénomène primaire qui commande l'évolution du germe pourrait fort bien porter sur un système proprement bactérien, tel que activation ou démasquage d'un enzyme. La réponse bactérienne au phage A ne peut plus être modifiée après la neuvième minute, et nous avons tout lieu de penser que c'est bien la réduction du germe A en prophage qui a lieu entre la sixième et la neuvième minute. Nous savons aussi que l'évolution vers la phase végétative est, durant six minutes, insensible au 5-méthyltryptophanne et qu'elle le devient ensuite. Aussi bien au cours de l'évolution réductive que de l'évolution productive, un phénomène irréversible a lieu vers la sixième minute. Il serait étrange qu'il y ait là coïncidence fortuite. Tout se passe comme si l'évolution germe \rightarrow gonophage, en l'absence de laquelle le développement du phage n'a pas lieu, était la réaction empêchée par le prophage, c'est-à-dire la réaction qui commande la sensibilité ou l'immunité. En d'autres termes, tout se passe comme si la réaction germe A \rightarrow prophage A empêchait quasi immédiatement l'évolution végétative du phage A ou *Ac*, c'est-à-dire l'évolution germe \rightarrow gonophage.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Comme toute bactérie infectée par un phage tempéré, *Salmonella typhi-murium* peut, soit produire du phage et se lyser (réponse productive), soit devenir lysogène (réponse réductive). Le sort de *Salmonella typhi-murium* infecté par le phage A dépend de la multiplicité. Le pourcentage des réponses réductives des bactéries en voie de croissance exponentielle en bouillon varie de 5 à 80 p. 100 lorsque la multiplicité varie de 1 à 10.

2° Le phage A donne des plages troubles. Le mutant *Ac* donne des plages claires et son quotient de lysogénisation est voisin de 10^{-3} . Les bactéries lysogènes A sont immunes contre le phage *Ac*. Des bactéries infectées par le phage *Ac* et qui se lysaient dans une proportion de 99,9 p. 100 sont sauvées par le phage A à multiplicité élevée si la surinfection est suffisamment précoce.

3° La probabilité de l'une ou l'autre réponse bactérienne en fonction d'une multiplicité donnée varie avec le milieu. Elle est plus faible en milieu synthétique qu'en bouillon. De nombreux agents ou substances favorisent les réponses productives. Ce sont les acides fumarique, succinique, *l*-malique, lactique, pyruvique, malonique, l'anaérobiose, le cyanure, un chauffage de dix minutes à 42°, divers inhibiteurs à des concentrations diminuant le taux de croissance (2-4 dinitrophénol, nitrure).

4° Une irradiation à l'U. V. avant l'infection favorise les réponses productives. L'effet d'une petite dose d'U. V. est toutefois compensé partiellement par des multiplicités élevées. Tout se passe comme si l'irradiation au moyen de l'U. V. d'une part, la multiplicité d'autre part, orientaient, chacune dans un sens, la réponse bactérienne, le résultat final dépendant du rapport des deux effets.

5° Les agents qui modifient la réponse bactérienne, chauffage à 42°, citrate, 5-méthyltryptophane, n'exercent le maximum de leur action qu'avant la sixième minute qui suit l'infection. Ils sont sans effet après la neuvième minute. C'est vraisemblablement entre la sixième et la neuvième minute que le matériel génétique du phage infectant est réduit en prophage.

6° Les six premières minutes de la phase latente sont insensibles à l'action inhibitrice du 5-méthyltryptophane. Tout se passe comme si, durant ces six minutes, le matériel génétique ou germe, du phage infectant se trouvait dans un état « neutre ». Le germe évoluera irréversiblement, suivant l'état bactérien, soit vers le gonophage et la phase végétative, soit vers le prophage.

7° Au cours de l'infection simultanée par les phages A et Ac, le sort de la bactérie dépendra du fait qu'un germe A a été réduit en prophage A, avant qu'ait eu lieu l'évolution irréversible du phage Ac vers le gonophage Ac. Cette évolution qui commande la phase végétative ne peut avoir lieu chez les bactéries possédant un prophage A.

APPENDICE.

On a vu que le 2-4-dinitrophénol et le nitrure à concentration permettant une croissance bactérienne à vitesse réduite favorisent les réponses productives. La question du mode d'action de ces substances à concentration inhibitrice se posait tout naturellement. Nous avons étudié l'effet du 2-4-dinitrophénol à pH 6,2, à une concentration $3,3 \times 10^{-3}$ M et celle du nitrure 10^{-2} M dans les mêmes conditions. Nous avons vérifié au préalable par des numérations de bactéries viables que les bactéries survivent au moins quatre-vingt-dix minutes dans ces conditions et que l'adsorption du phage n'est pas modifiée par les inhibiteurs.

Si à des suspensions bactériennes en bouillon, à pH 6,2, on ajoute les inhibiteurs et le bactériophage Ac à multiplicité 20, et que l'on dénombre à temps divers le nombre de bactéries survivantes et le nombre de centres infectieux, on constate que celui-ci diminue pendant que celui-là augmente (voir fig. 8 A). Les colonies qui survivent se montrent constituées par des bactéries non lysogènes et sensibles. Si le 2-4-dinitrophénol est ajouté deux minutes après l'infection, le pourcentage des bactéries survivantes est déjà considérablement diminué (fig. 8 B).

Les résultats peuvent être interprétés de deux façons :

a) Ou bien les phages sont adsorbés, mais le matériel génétique

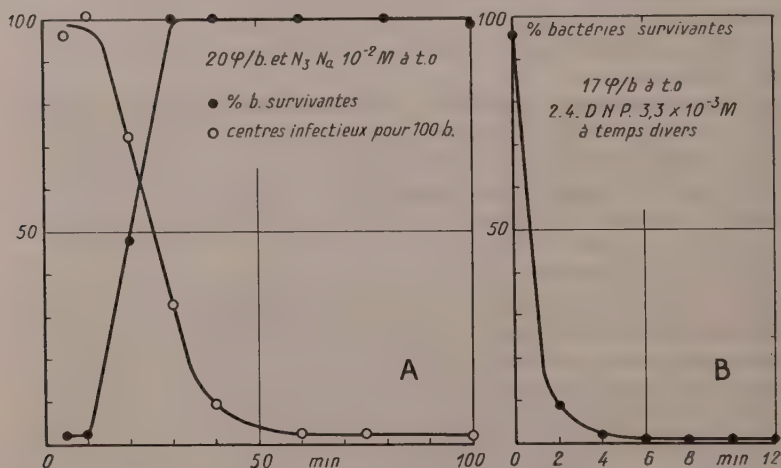


FIG. 8. — Influence du nitrate et du 2-4-dinitrophénol sur l'évolution du phage Ac.

- A. — Des bactéries en voie de croissance exponentielle en bouillon à pH 6,2 sont infectées à temps 0 en présence de nitrate. A intervalles divers, les suspensions sont diluées en sérum antiphage A à 10^{-3} et après quinze minutes on étale pour dénombrer les bactéries survivantes d'une part, les centres infectieux d'autre part. On notera qu'un séjour de trente minutes permet une survie de la quasi totalité des bactéries. Les survivantes ne sont pas lysogènes et sont sensibles. Les résultats sont les mêmes si le nitrate est remplacé par le 2-4-dinitrophénol.
- B. — Si le dinitrophénol est ajouté à temps divers après le phage, on voit que le pourcentage des bactéries qui peuvent être sauvées diminue rapidement. Il est inférieur à 10 p. 100 à la deuxième minute.

du phage n'est pas injecté dans les bactéries et est inactivé d'une manière ou d'une autre.

b) Ou bien le matériel génétique du phage est injecté dans la bactérie et y est détruit.

Si des bactéries infectées par le phage Ac en présence de 2-4-dinitrophénol ou de nitrate sont laissées trente minutes en

contact avec l'inhibiteur, puis diluées dans un milieu sans inhibiteur et surinfectées avec du phage Ac, on constate que le pourcentage des bactéries survivantes varie de 3 à 45 p. 100. Dans le témoin traité par les inhibiteurs en l'absence de phage Ac, puis infecté après dilution dans des conditions identiques, le pourcentage des survivantes est voisin de 0,1 p. 100. Tout se passe donc comme si, en présence des inhibiteurs et du phage, les bactéries devenaient temporairement réfractaires à une surinfection. Mais les bactéries qui survivent dans ces conditions ne sont pas lysogènes et sont sensibles. Il semble ainsi que les phages, en présence des inhibiteurs, modifient temporairement l'état bactérien.

Il faut noter d'ailleurs que le 2-4-dinitrophénol à concentration élevée, agissant sur les bactéries à pH 6,2, prolonge la période latente d'une période supérieure au temps durant lequel il agit. On a ajouté du 2-4-dinitrophénol, $3,3 \times 10^{-2}$ M à diverses périodes de l'infection. A temps variables, les bactéries sont diluées 100 fois dans un milieu neuf. On a alors suivi les courbes d'apparition des phages intra-bactériens après traitement au cyanure. A pH 6,2, les premiers phages apparaissent vers la trentième minute dans le témoin. En présence de 2-4-dinitrophénol, les courbes d'apparition du phage sont décalées par rapport à la courbe témoin. L'importance du décalage qui est indiquée sur le tableau ci-contre varie suivant la période d'action. Les chiffres donnés ici correspondent aux valeurs de décalage pour des traitements de deux, six et douze minutes à temps divers, après l'infection qui marque le temps 0.

PÉRIODE DE TRAITEMENT par le 2-4 dinitrophénol	DÉCALAGE (en minutes)
0 à 2 minutes	15
0 à 6 minutes	25
2 à 8 minutes	20
6 à 12 minutes	20
6 à 18 minutes	35
15 à 21 minutes	10
15 à 27 minutes	17

On voit que le retard est d'autant plus marqué que la période d'action suit de plus près l'infection. Après la quinzième minute, le décalage est beaucoup moins prononcé. Ce sont donc les premiers stades de l'évolution du phage qui sont les plus sensibles à l'action du 2-4-dinitrophénol.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. S. K. BOYD. *J. Path. Bact.*, 1950, **62**, 501-517 ; *Ibid.*, 1951, **63**, 445-457.
- [2] F. JACOB, A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1953, **84**, 222.

- [3] A. LWOFF. *Bact. Rev.*, 1953, **17**, 269.
- [4] A. LWOFF, A. KAPLAN et E. RITZ. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 2126-2128.
- [5] W. R. PARRY et J. EDWARDS. *J. gen. Microb.*, 1953, **9**, 342-349.
- [6] S. S. COHEN et T. F. ANDERSON. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 511-523.
- [7] M. LIEB. *J. Bact.*, 1953, **65**, 642-651.
- [8] F. JACOB. In A. Lwoff, *Bact. Rev.* (sous presse).

BIOSYNTHÈSE INDUITE ET MODE D'ACTION D'UNE PYOCINE, ANTIBIOTIQUE DE *PSEUDOMONAS PYOCYANEA* (*)

par FRANÇOIS JACOB (**).

(Service de Physiologie microbienne. Institut Pasteur Paris.)

INTRODUCTION.

Une substance antibiotique a été obtenue dans les filtrats de culture d'une souche de *Pseudomonas pyocyanea*. Cette substance agit exclusivement sur quelques autres souches de la même espèce. Sa synthèse peut être induite dans l'ensemble d'une population bactérienne, par exposition à l'action de certains agents mutagènes. Son apparition dans le milieu de culture est la conséquence de la lyse bactérienne. Enfin, elle est adsorbée spécifiquement à la surface des bactéries sensibles. Cette substance diffère donc, par ses propriétés, de la plupart des substances antibiotiques telles que la pyocyanine, l'acide pyolipique [1] ou les « composés pyo » [2] antérieurement isolés des cultures de *P. pyocyanea*. Par contre, elle s'apparente étroitement aux colicines.

On sait, depuis les travaux de Gratia [3] et de Frédéricq [4], que certaines souches d'*Escherichia coli* sont capables de produire des substances antibiotiques, actives spécifiquement sur d'autres souches de la même espèce. Ces substances, désignées sous le nom de *colicines*, sont adsorbées sur des récepteurs spécifiques des bactéries sensibles et entraînent la mort de ces bactéries, sans toutefois être reproduites par elles. Les colicines ne sont donc pas transmissibles en série, ce qui les distingue des bactériophages. Les colicines étudiées se différencient entre elles par diverses propriétés telles que leur spectre d'activité, leur diffusibilité, ainsi que leur stabilité à l'égard de certains agents physiques ou chimiques [4, 5].

Chez certaines bactéries productrices de colicine, telle la souche *E. coli* ML, la production de colicine peut être induite

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du *National Cancer Institute of the National Institutes of Health* des Etats-Unis d'Amérique.

(**) Manuscrit reçu le 23 octobre 1953.

par le rayonnement U.-V. [6], dans les mêmes conditions que la production de bactériophages par les bactéries lysogènes [7]. L'irradiation induit la synthèse de la colicine, qui, après une période latente, est libérée par la lyse des bactéries.

Il était particulièrement intéressant de retrouver dans d'autres espèces microbiennes les phénomènes observés sur *E. coli* ML. La substance découverte dans les cultures de *P. pyocyanea* remplit ces conditions. Par analogie avec les colicines, elle a été désignée sous le nom de *pyocine*.

Les expériences présentées dans ce mémoire ont trait, d'une part à la production de pyocine par les bactéries exposées à un rayonnement ultra-violet, d'autre part au mode d'action de cette pyocine sur les bactéries sensibles.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

Souches bactériennes. — La souche de *P. pyocyanea* libérant de la pyocine est la souche P10 (1) qui produit du pigment fluorescent, mais non de la pyocyanine. La température optima pour sa culture est de 37°.

La souche 13 qui est sensible à l'action de la pyocine a été décrite dans un précédent mémoire [8].

Milieux. — Le milieu synthétique employé a la composition suivante : KH_2PO_4 , 13,6 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,01 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,0005 g ; eau, 1 000 g ; KOH q. s. pour pH 7. La source de carbone (glucose) est ajoutée au moment de l'emploi, de manière à obtenir une concentration de 3 g par litre.

Les boîtes de milieu gélosé contiennent : peptone Uclaf, 10 g ; NaCl, 10 g ; gélose, 10 g ; eau, 1 000 g. Elles sont ajustées à pH 7.

Irradiation. — Les irradiations ont été faites avec une lampe à vapeur de mercure à haute tension et basse pression, donnant approximativement une énergie de 500 ergs/mm⁻²/minute⁻¹ pour la longueur d'onde 2537 Å, la culture étant placée à 1 m. de la lampe. Les doses seront données en secondes d'irradiation à 1 m.

RÉSULTATS.

I. PROPRIÉTÉS DE LA PYOCINE. — *Mise en évidence et titrage.* — La substance antibiotique présente dans les cultures de la souche 10 peut être facilement décelée en déposant, après centrifugation de la culture, une goutte du liquide surnageant à la surface d'une boîte de gélose préalablement ensemencée avec des bactéries 13 sensibles. Après une nuit à 37°, l'action de l'antibiotique se manifeste par une zone claire, qui traduit l'inhibition de la croissance bactérienne.

Si, à l'aide d'un fil de platine, on prélève de la gélose de cette

(1) Nous tenons à remercier le Dr L. Dickinson qui nous a aimablement envoyé cette souche.

zone claire, et si on la transfère sur la surface d'une seconde boîte de gélose ensemencée avec des bactéries 13, on n'observe pas de zone claire après séjour à 37°. L'agent inhibant la croissance de *P. pyocyanea* 13 n'est donc pas transmissible en série.

Aucun bactériophage n'a pu être décelé dans les filtrats de culture 10, après essai sur 38 souches différentes de *P. pyocyanea*.

L'inhibition de la croissance de *P. pyocyanea* 13 sur gélose peut être utilisée pour le titrage de la pyocine. Des gouttes d'environ 0,02 ml de dilutions successives de la solution à doser sont déposées à la surface d'une boîte de gélose ensemencée avec environ 10^7 bactéries sensibles. La boîte est laissée dix-huit heures à 27°. On peut arbitrairement définir comme unité (UA) la plus grande dilution qui, dans ces conditions, provoque la formation d'une zone claire tranchant nettement sur le fond uni de la culture.

Chaque bactérie de la souche P 10 est capable de transmettre le caractère « pyocinogène ». Si l'on ensemence quelques bactéries 10 sur une boîte de gélose, et si, après quelques heures à 37°, on pulvérise à la surface de la gélose, une culture de bactéries sensibles 13, on constate, après un séjour de quinze heures à 37°, que chaque colonie de 10 est entourée d'une zone claire traduisant l'inhibition de la croissance des bactéries 13.

Propriétés physico-chimiques. — La pyocine 10 n'est pas dialysable, mais diffuse assez rapidement dans la gélose. Elle n'est pas sédimentée par une centrifugation de deux heures à 20 000 g. Lorsque l'on filtre des solutions de pyocine en tampon phosphate sur des bougies de porcelaine Chamberland L3, l'activité est presque totalement retenue. L'activité n'est pas diminuée après chauffage à 60° pendant trente minutes à pH 7, mais elle est réduite à 10 p. 100 après dix minutes à 80°.

La pyocine n'est pas sensible à l'action des protéases. Son activité n'est pas modifiée en présence de trypsine ou de papaïne. Elle est également insensible à l'action de la ribonucléase et de la désoxyribonucléase.

On peut la concentrer et la purifier partiellement par précipitation des solutions avec du sulfate d'ammonium. Après addition d'une quantité de sulfate d'ammonium suffisante pour obtenir une concentration finale de 66 p. 100, la moitié de l'activité antibiotique se retrouve dans le précipité. Avec une concentration finale de 75 p. 100 de sulfate d'ammonium, on obtient dans le culot plus de 90 p. 100 de l'activité antibiotique totale.

La pyocine est extrêmement résistante à l'action du rayonnement ultra-violet. L'activité n'est pas modifiée par une exposition de deux heures à un rayonnement qui, dans les mêmes conditions, inactive en quatre-vingts secondes 99 p. 100 d'une suspension de bactériophages T2.

Il est vraisemblable que la pyocine est une substance de nature protéique, ou tout au moins comprenant une fraction protéique. Sa grande diffusibilité dans la gélose suggère qu'il s'agit d'une substance de poids moléculaire relativement peu élevé.

II. BIOSYNTHESE INDUITE DE LA PYOCINE. — La production de pyocine par les bactéries 10 est induite par le rayonnement U.-V. dans des conditions analogues à la production de phages par les bactéries lysogènes inductibles [7], et à la production de colicine par les bactéries colicinogènes inductibles [6].

Les cultures de *P. pyocyanea* 10, en milieu synthétique

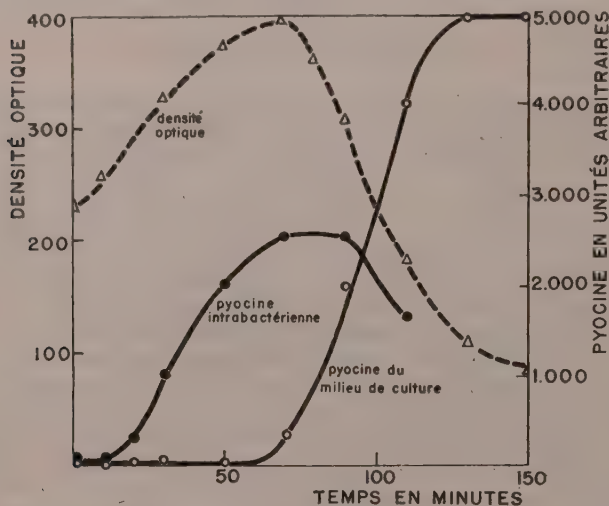


FIG. 1. — Production de pyocine après irradiation des bactéries *P. pyocyanea* 10. — Une culture de bactéries 10 en milieu synthétique glucosé, contenant $3,2 \cdot 10^8$ bactéries/ml, est irradiée par les rayons U.-V. pendant dix secondes à 1 m (temps 0). A temps variables, un échantillon de la culture est centrifugé. Le culot bactérien est broyé avec du sable et remis en suspension dans le volume initial. La pyocine est dosée, d'une part dans le liquide surnageant de la culture, d'autre part dans le broyat des bactéries. En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, la densité optique exprimée en graduations de l'électrophotomètre de Meunier, et le nombre d'« unités arbitraires » trouvé dans le milieu et dans le broyat des bactéries.

glucosé, contiennent peu de pyocine. Dans une culture titrant 10^8 bactéries/ml, on en décèle environ 20 à 30 UA/ml dans le milieu de culture et moins de 10 UA/ml dans les corps microbiens après broyage par le sable.

Une telle culture en milieu synthétique glucosé est exposée à une dose convenable de rayons U.-V., et l'on suit simulta-

nément l'évolution de la densité optique et la teneur en pyocine, d'une part dans le milieu de culture, d'autre part dans les corps microbiens broyés. Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure 1. On voit qu'après l'irradiation, la croissance bactérienne se poursuit à vitesse décroissante jusqu'à la soixante-dixième minute, qui marque le début de la lyse. A ce moment seulement, la pyocine apparaît dans le milieu. Sa concentration s'accroît à mesure que progresse la lyse. Dans les corps bactériens au contraire, la teneur en pyocine est déjà importante trente minutes après l'irradiation et elle augmente rapidement jusqu'au moment de la lyse.

Le rayonnement U.-V. induit donc la synthèse de la pyocine, qui, après une « période latente » de soixante-dix minutes, est libérée dans le milieu par la lyse des bactéries.

L'augmentation de densité optique observée pendant la période latente correspond bien à des synthèses bactériennes : l'étude de la respiration montre en effet une augmentation de l'intensité respiratoire sensiblement parallèle à l'augmentation de la densité optique. La lyse s'accompagne d'une chute de cette intensité respiratoire.

Les cultures de *P. pyocyanea* sont, en général, très sensibles à l'action létale des rayons U.-V. Les souches lysogènes 13(4) et 13(8) par exemple, sont trois à cinq fois plus sensibles qu'*E. coli* K 12. Cependant, la souche *P. pyocyanea* 10 est encore beaucoup plus sensible que les autres souches de *P. pyocyanea*. Une dose de cinq secondes correspondant approximativement à une énergie de 40 ergs/mm^{-2} pour la longueur 2537 \AA , laisse plus de 90 p. 100 de survivants chez les bactéries lysogènes 13(8), et seulement $2 \cdot 10^{-3}$ survivants chez les bactéries 10. Cette sensibilité particulièrement marquée pourrait s'expliquer par l'action d'une substance photosensibilisatrice, présente dans les bactéries 10. Toutefois, entre 2 000 et 6 000 \AA , il n'y a pas de différence significative entre la courbe d'adsorption des bactéries 13 et celle des bactéries 10, mesurées au spectrophotomètre de Beckman.

Comme l'induction des bactéries lysogènes, l'induction des bactéries pyocinogènes 10 peut être supprimée par l'action de la lumière visible appliquée après le rayonnement U.-V.

Enfin, comme les rayons U.-V., l'ypérite azotée induit la synthèse de la pyocine, mais cette induction n'est pas photorestaurable.

Les résultats des expériences précédentes sont tout à fait comparables à ceux obtenus après induction de la souche colicinogène ML. Ils montrent qu'il existe de très grandes analogies entre les bactéries lysogènes inductibles et les bactéries pyocinogènes ou colicinogènes inductibles. Dans les trois cas, en effet, la croissance bactérienne se poursuit à vitesse décroissante jusqu'à la lyse et la synthèse des enzymes respiratoires demeure possible. Comme les bactériophages des bactéries lysogènes, la

pyocine et la colicine des bactéries productrices ne sont libérées dans le milieu que par la lyse des bactéries.

III. MODE D'ACTION DE LA PYOCINE. — *Action létale de la pyocine sur les bactéries sensibles.* — On sait que les colicines, comme les bactériophages, présentent une grande spécificité d'action, due à leur adsorbabilité sur des récepteurs présents seulement chez les bactéries sensibles [4, 9]. Dans le cas de la colicine ML,

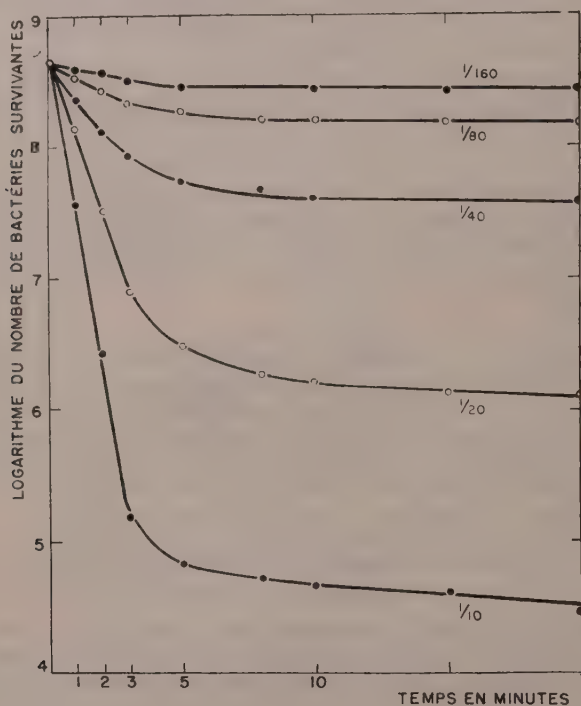


FIG. 2. — Survie des bactéries *P. pyocyanea* 13 exposées à des dilutions variables d'une solution de pyocine. — A des échantillons de 0,9 ml d'une suspension de *P. pyocyanea* 10 contenant 4.10^8 bactéries/ml, on ajoute 0,1 ml de dilutions d'une solution de pyocine, de manière à obtenir les dilutions finales : 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. Les tubes sont laissés à 27°. A des temps variables, des échantillons sont prélevés, dilués et étalés sur gélose, pour permettre de mesurer le nombre des bactéries capables de former des colonies. En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, le logarithme du nombre des bactéries formant une colonie.

il a, de plus, été possible de montrer que la fixation d'une seule « particule » de colicine suffit à entraîner la mort d'une bactérie [6].

L'action létale de la pyocine ressemble, à bien des égards, à celle de la colicine, ainsi qu'en témoigne l'étude des courbes de survie en fonction du temps d'une même suspension de bactéries sensibles exposées à diverses dilutions d'une solution de pyocine (fig. 2 et tableau I).

TABEAU I. — Action létale de la pyocine sur les bactéries sensibles.

1 dilution de la pyocine d	2 Nombre final de bactéries tuées N x 10 ⁶	3 1/d x N x 10 ⁹	4 Nombre de bactéries tuées en 30 secondes (vitesse initiale) V x 10 ⁶	5 $\frac{1}{d} \times V$ x 10 ⁹
1/10	> 750	-	-	-
1/20	> 750	-	718	14,4
1/40	609	24	453	18
1/80	380	27	221	17,8
1/160	174	28	112	18
1/320	99	32	63	20
1/640	47	30	29	18,5

Ce tableau résume les résultats d'expériences analogues à celle représentée sur la figure 3, mais le nombre initial des bactéries varie suivant la dilution de pyocine utilisée.

On voit que pour les faibles dilutions de la pyocine, les courbes de la figure 2 sont sensiblement rectilignes dans leur segment initial. Pour les grandes dilutions, les courbes se terminent par un plateau. On peut montrer que dans ce segment de la courbe le nombre de bactéries survivantes demeure constant, par suite de l'épuisement de la pyocine. Si, après trente minutes, on centrifuge les mélanges contenant de la pyocine à 1/80 ou 1/160, et si l'on ajoute au liquide surnageant une suspension fraîche de bactéries 13, on constate que le nombre de bactéries viables ne varie plus, quelle que soit la durée du contact entre les bactéries et le liquide surnageant.

Les résultats numériques d'expériences analogues à celle illustrée par la figure 2, sont résumés dans le tableau I qui présente, pour chaque dilution de la pyocine, le *nombre total* de bactéries tuées (plateau terminal), et le *nombre de bactéries tuées pendant les trente premières secondes à 37°* (vitesse initiale). L'examen des colonnes 2 et 3 montre que le nombre total de bactéries tuées est, pour les dilutions les plus grandes, inversement proportionnel à la dilution de la pyocine. Il est donc

possible de définir une « unité létale » de pyocine (U. L.), qui est la quantité nécessaire pour tuer une bactérie. Dans ces expériences, la dilution 1/320 de la solution employée est suffisamment grande pour que soit éliminée la fixation de plusieurs unités létales sur une même bactérie, mais elle tue cependant un nombre suffisamment élevé de bactéries pour permettre des mesures précises. On peut, pour cette dilution, évaluer le titre de la pyocine à 10^8 UL/ml, ce qui permet d'estimer la concentration de la solution initiale à $3,2 \cdot 10^{10}$ UL/ml.

L'allure exponentielle, dans leur segment initial, des courbes de survie des bactéries soumises à l'action de petites dilutions de pyocine, est compatible avec l'hypothèse selon laquelle un seul événement est responsable de la mort d'une bactérie. L'examen des colonnes 4 et 5 du tableau I, qui montrent la proportionnalité existant entre la concentration de la pyocine et la vitesse initiale de son action bactéricide, suggère que cet événement correspond à la fixation d'une seule « particule ».

Si l'on fait l'hypothèse que chaque unité létale correspond à une seule « particule » de pyocine, il est possible d'estimer la vitesse de fixation de la pyocine sur les bactéries sensibles, d'après l'équation :

$$\frac{dB}{dt} = -KCB \quad (1)$$

où B représente le nombre de bactéries survivant au temps t à l'action d'une concentration C de pyocine. La constante de vitesse K est la constante d'adsorption de la pyocine sur les bactéries. L'intégration de l'équation (1) permet de calculer la constante d'adsorption K, d'après les résultats expérimentaux. La valeur moyenne trouvée pour K est de $29 \cdot 10^{10}$ ml/min.

Cette valeur est un peu supérieure à celle trouvée chez les bactériophages, où l'efficacité des collisions est très voisine de l'unité. Elle est environ 3,5 fois plus élevée que celle de la colicine, et ceci est vraisemblablement dû au fait que les « particules » de pyocine sont de taille inférieure à celles de la colicine.

On peut, par la mesure de la survie des bactéries soumises à une dilution connue de pyocine, évaluer le rendement moyen des bactéries pyocinogènes induites. La solution utilisée dans les expériences décrites par le tableau I provient d'un lysat de $2,7 \cdot 10^8$ bactéries/ml induites en milieu glucosé. Ce rendement peut ainsi être estimé à :

$$\frac{3,2 \cdot 10^{10}}{2,7 \cdot 10^8} = 117 \text{ UL}$$

de pyocine par bactérie. Le rendement moyen de bactéries induites en bouillon est 5 à 10 fois supérieur.

Les résultats des expériences précédentes présentent donc une

grande analogie avec les expériences similaires, où l'agent bactéricide est la colicine. Dans les deux cas, l'irréversibilité de la fixation, le taux d'adsorption, le rendement unitaire par bactérie productrice suivant les conditions de culture sont très comparables à ce que l'on peut observer avec des bactériophages tels que T2 ou T4.

Métabolisme des bactéries sensibles soumises à l'action de la colicine. — Après la fixation sur les bactéries sensibles, l'action de la pyocine sur le métabolisme de ces bactéries semble être aussi brutale que celle de la colicine ML. Dans l'expérience

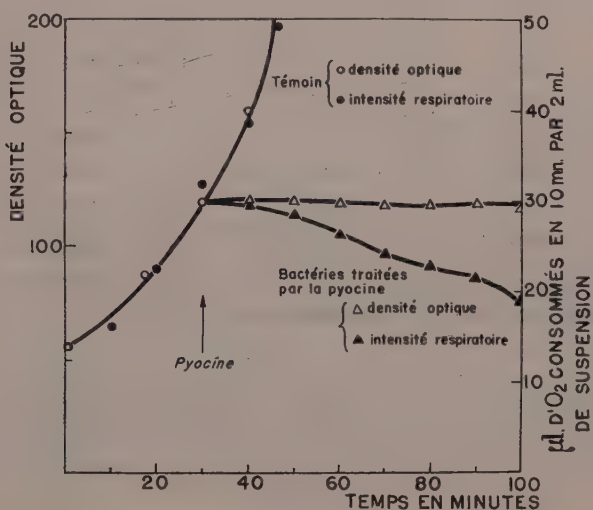


FIG. 3. — Métabolisme des bactéries *P. pyocyanea* 13 traitées par la pyocine. — A une culture de bactéries 13 en phase exponentielle de croissance, on ajoute, au temps $t =$ trente minutes, une quantité de pyocine laissant 0,009 survivants en deux minutes. Sur des échantillons de cette suspension, on mesure la densité optique. Une fraction est distribuée dans les fioles de l'appareil de Warburg (2 ml/fiole), agitée à 37° en présence de KOH, et l'on mesure la consommation d'oxygène. En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, la densité optique exprimée en graduations de l'électrophotomètre de Meunier et les $\mu\text{l O}_2$ consommés en dix minutes par une suspension-témoin, et par la suspension ayant reçu de la pyocine.

représentée sur la figure 3, on a ajouté à une culture de bactéries 13 en voie de croissance exponentielle une quantité de pyocine laissant moins de 1 bactérie survivante pour 100 en une minute. On voit que la croissance bactérienne est immédiatement arrêté et que l'intensité respiratoire demeure constante pendant dix à vingt minutes, puis décroît progressivement.

La pyocine semble donc bloquer les synthèses bactériennes.

Elle empêche aussi la reproduction d'un bactériophage virulent tel que P2 (2) [tableau II].

TABLEAU II. — Action de la pyocine sur la multiplication d'un bactériophage virulent chez *P. pyocyane* 13.

Temps d'addition de la pyocine	Nombre de bactéries productrices de phages N	N/N ₀
0	0	0
7	0	0
10	0	0
12	0	0
15	7	0,06
18	34	0,30
21	69	0,62
23	94	0,84
Témoin (N ₀)	112	1,0

A 1,9 ml d'une culture en bouillon de *P. pyocyanea* 13 contenant $10,5 \cdot 10^8$ bactéries/ml, on ajoute 0,1 ml d'une suspension de bactériophage P2 contenant $8,8 \cdot 10^8$ particules/ml (temps 0). Après cinq minutes d'adsorption, la suspension est diluée à 1/10 dans du bouillon additionné de sérum spécifique antiphage, et agitée à 37°. Une centrifugation montre que 47 p. 100 des bactériophages ont été adsorbés. A des temps variables, on prélève 0,9 ml de suspension, auxquels on ajoute 0,1 ml d'une dilution de pyocine, qui en deux minutes laisse 1 survivant p. 100. Après deux minutes, les suspensions sont diluées et étalées sur gélosa avec la souche indicatrice, avant la lyse.

DISCUSSION.

Les expériences décrites dans ce mémoire montrent clairement que les propriétés de la pyocine sont en tous points comparables à celles de certaines colicines. Ces deux types de substances, vraisemblablement de nature protéique, sont libérés par la lyse bactérienne et, chez certaines souches, leur synthèse peut être induite par exposition des cultures à l'action de certains agents mutagènes ou cancérigènes. Elles sont adsorbées irréversiblement à la surface de bactéries sensibles de la même espèce et une « particule » suffit à entraîner la mort de la bactérie réceptrice. Enfin, leur action sur le métabolisme des bactéries sen-

(2) Le bactériophage P2 est un petit phage virulent donnant de grandes plages sur la souche 13. En milieu synthétique glucosé, 50 p. 100 des particules sont adsorbées en dix minutes à 37°, la période latente est de vingt-cinq à vingt-sept minutes, et le rendement moyen par bactérie de cinquante à soixante-dix [8].

sibles apparaît également rapide et brutale, puisque dans les deux cas les synthèses bactériennes étudiées sont bloquées après addition du produit, sans période latente mesurable expérimentalement.

L'ensemble de ces propriétés permet donc de distinguer la pyocine et les colicines des antibiotiques classiques du type pénicilline ou streptomycine. Le terme de *bactériocine* a été proposé [10] pour cette classe particulière de protéines antibiotiques, dont la biosynthèse est létale pour la bactérie productrice, et dont l'adsorption est conditionnée par la présence d'un récepteur spécifique. Il est très vraisemblable que de telles bactériocines existent non seulement chez *E. coli* et *P. pyocyanea*, mais également chez d'autres espèces bactériennes.

Les relations entre ces bactériocines et les bactériophages, tant du point de vue de leur production que de celui de leur mode d'action, sont évidentes et ont déjà été plusieurs fois longuement discutées [4, 6, 11]. Il paraît inutile d'y revenir une nouvelle fois. Cependant, cette comparaison ne vaut que par l'analogie des propriétés observées chez les bactériophages d'une part et les bactériocines d'autre part. Bien que certaines souches bactériennes aient été décrites, dans les cultures desquelles on peut mettre en évidence simultanément une colicine et un ou plusieurs bactériophages, aucune preuve expérimentale directe, soit d'une relation immunologique entre colicine et bactériophage, soit du passage d'une souche lysogène à une souche colicinogène ou vice-versa, n'a pu encore être fournie.

RÉSUMÉ.

1° Les bactéries de la souche 10 de *P. pyocyanea* sont capables de produire une substance antibiotique, la pyocine, active sur d'autres souches de *P. pyocyanea*.

2° La synthèse de la pyocine par plus de 90 p. 100 des bactéries d'une culture de *P. pyocyanea* 10 peut être induite par exposition des cultures à de faibles doses de rayons U.-V. ou d'autres agents mutagènes et cancérogènes. La pyocine apparaît d'abord dans les bactéries, puis est libérée dans le milieu par la lyse bactérienne.

3° La pyocine est adsorbée sur les bactéries sensibles. Une « particule » semble suffisante pour entraîner la mort d'une bactérie.

4° Le rendement des bactéries pyocinogènes induites est d'environ 100 « particules » en milieu synthétique, de 500 à 1 000 en bouillon.

5° Les bactéries sensibles traitées par la pyocine sont incapables de poursuivre leur synthèse.

6° L'ensemble de ces propriétés permet de rapprocher la pyocine des colicines, qui forment une classe particulière d'antibiotiques : les bactériocines. Bactériophages et bactériocines présentent de nombreuses analogies, tant par leur mode de production que par leur mode d'action. Toutefois, aucune preuve expérimentale directe de leur parenté n'a pu encore être fournie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. BERGSTROM, H. THEORELL et H. DAVIDE. *Arch. Bioch.*, 1946, **10**, 165.
- [2] E. E. HAYS, I. C. WELLS, P. A. KATZMAN, C. K. CAIN, F. A. JACOBS, S. A. THAYER, E. A. DOISY, W. L. GABY, E. C. ROBERTS, R. D. MUIR, C. J. CARROLL, L. R. JONES et N. J. WADE. *J. Biol. Chem.*, 1945, **159**, 725.
- [3] A. GRATIA. *Ces Annales*, 1932, **48**, 413.
- [4] P. FRÉDÉRICQ. *Ces Annales*, 1953, **84**, 294.
- [5] V. CHABBERT. *Ces Annales*, 1950, **79**, 51.
- [6] F. JACOB, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1952, **83**, 295.
- [7] A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et N. KJELDGAARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 815.
- [8] F. JACOB. *Ces Annales*, 1952, **82**, 578.
- [9] P. BORDET et J. BEUMER. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 259.
- [10] F. JACOB, A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1953, **84**, 222.
- [11] F. JACOB, L. SIMINOVITCH et E. L. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1953, **84**, 313.

ISOLEMENT ET EMPLOI DE PHAGES NOUVEAUX POUR IDENTIFIER LES SOUCHES DE STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES INSENSIBLES AUX PHAGES CLASSIQUES

par R. WAHL et J. FOUACE (*).

(Institut Pasteur.)

Grâce aux améliorations apportées à la méthode, on peut actuellement identifier par les phages un très grand nombre de souches de staphylocoques pathogènes ; en particulier l'emploi des faibles dilutions de phages représente un progrès sérieux [4]. Mais il faut compter encore avec un reliquat assez important de souches non identifiables par les phages aujourd'hui utilisés dans la plupart des laboratoires, et que nous appellerons, dans la suite, les *phages classiques*.

Par exemple sur 455 souches [isolées en France ou en Italie] (1), prises au hasard, 113 (25 %) n'étaient pas identifiables avec les phages classiques aux dilutions critiques ; une partie de celles-ci l'était avec les phages classiques dilués au 1/4. Il restait cependant 30 souches (soit 6 % du total) qui ne donnaient aucune réaction ou seulement des fausses réactions avec les phages classiques, même non dilués, c'est-à-dire qui étaient réellement non identifiables par ces phages.

Deux de ces souches ont été perdues. Par ailleurs, des souches non identifiables par les phages classiques isolées en Grande-Bretagne nous ont été fournies aimablement par R. E. O. Williams et J. E. Rippon. Au total nous disposions de 53 souches non identifiables par les phages classiques, dont 28 de notre collection et 25 de celle de Williams.

LES PHAGES PRODUITS PAR LES SOUCHES ACTUELLEMENT IDENTIFIABLES
SONT INACTIFS SUR LES SOUCHES NON IDENTIFIABLES.

Nous avons d'abord cherché des phages actifs sur ces souches, d'une part parmi ceux qui nous ont été envoyés par d'autres labo-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 novembre 1953.

(1) Nous devons ces dernières à l'obligeance de G. Rita.

ratoires ; d'autre part parmi ceux que nous avons isolés à partir de souches lysogènes identifiables par les phages classiques.

1° *Les phages envoyés par d'autres laboratoires étaient pour la plupart inactifs* sur nos souches non identifiables par les phages classiques ; quelques-uns montraient une faible activité sur certaines souches :

En effet :

a) Les phages de Williams Smith [8], provenant de staphylocoques lysogènes pathogènes pour les animaux étaient inactifs.

b) Parmi les phages isolés par R. E. O. Williams et J. Rippon [7], les phages 70 et 55 non dilués ont donné quelques plages chacun sur une souche différente. Par entraînement sur ces souches, nous avons obtenu les phages nouveaux 55 A et 70 A.

c) Le phage 31 B, de P. Rountree [3], non dilué s'est montré actif sur 5 souches.

d) Les phages T 230-51 et W de Saint-Martin n'étaient actifs sur aucune souche.

2° *Les phages isolés de souches lysogènes identifiables par les phages classiques se sont montrés inactifs sur les souches non identifiables par ces phages.* — Il est assez fréquent que chez des souches de staphylocoques conservées à la glacière ou au laboratoire en milieu liquide ou solide, la proportion de bactéries spontanément lysées devienne soudain très grande. Nous discuterons plus loin les interprétations possibles de ce phénomène.

En tout cas, il est facile avec de telles souches d'obtenir une préparation de phages de titre élevé. Il suffit d'en faire une culture de cinq heures en eau peptonée glucosée à 37°. On place ensuite cette culture à la glacière pendant dix-huit heures et on la filtre, après la lyse. La souche productrice est, en général, résistante à son phage, mais on trouve d'autres souches qui lui sont sensibles, et on peut en entraînant les phages sur ces souches obtenir des préparations de titre élevé.

Celles-ci ne se sont jamais montrées actives sur des souches non identifiables par les phages classiques. Par contre elles sont actives sur un plus ou moins grand nombre de souches identifiables par les phages classiques. Dans la plupart des cas, elles sont actives sur les souches du même groupe que la souche originelle ; et parfois aussi sur des souches d'autres groupes (2). Nous donnerons quelques exemples pour des phages essayés chacun sur 70 souches dont 16 appartenant au groupe I, 18 au groupe II, 13 au groupe III, 16 au groupe IV et 7 sensibles à des phages de plusieurs groupes.

Le phage 518, extrait d'une souche du *groupe I*, était actif sur

(2) Ces groupes ont été décrits dans une publication antérieure [4].

3 souches du *groupe I*, sur 2 souches du *groupe II* et sur 1 souche du *groupe IV*.

Le phage 702, extrait d'une souche du *groupe II* était actif sur 3 souches du *groupe II*.

Le phage 730, extrait d'une souche du *groupe III*, était actif sur 7 souches du *groupe III* et sur une souche du *groupe II*.

Le phage 99, extrait d'une souche du *groupe II*, est actif sur 7 souches du *groupe II*.

Il semble donc que la plupart des phages produits par les souches de staphylocoques lysogènes sensibles aux phages classiques et isolés dans ces conditions soient apparentés, si l'on en juge par leur gamme d'action, aux phages auxquels la souche productrice est sensible. Il était vraisemblable qu'il en serait de même pour les phages produits par des souches insensibles aux phages classiques. S'il en était ainsi il fallait s'attendre à ce que les souches non identifiées par les phages classiques ne soient identifiables que par des phages nouveaux provenant d'autres souches non identifiées par les phages classiques et aussi à ce que certains au moins de ces phages nouveaux aient une gamme d'action très différente de celle des phages classiques.

Ces hypothèses ont été vérifiées, comme nous allons le montrer.

ISOLEMENT ET SÉLECTION DE PHAGES NOUVEAUX À PARTIR DE SOUCHES NON IDENTIFIABLES PAR LES PHAGES CLASSIQUES.

Notre méthode est dérivée de celle de Fisk [4]. Elle comporte les temps suivants :

1° *Premier isolement de phages.* — De chacune de ces souches on fait à 37° une culture de dix-huit heures sur gélose. De chaque culture sur gélose on fait une émulsion en eau physiologique que l'on ensemence en nappe sur une plaque de gélose. On laisse sécher et on dépose 1 goutte d'une culture en eau peptonée de chacune des autres souches. Après dix-huit heures à 30° ou cinq heures à 37° on observe des lyses (lyse totale ou plages) au niveau de certaines gouttes.

On lave ces zones de lyse avec un peu d'eau peptonée et on dépose 1 goutte du liquide de lavage, *non filtré ni centrifugé* (3) sur une culture de chacune des deux souches dont la conjonction a produit la lyse. On détermine ainsi quelles sont la souche détectrice et la souche lysogène.

2° *Entraînement des phages sur la souche détectrice.* Pour cela on essaie à la fois les deux méthodes suivantes :

(3) Avec les liquides filtrés ou même seulement centrifugés on obtient beaucoup moins de résultats positifs, probablement parce que ces phages au moment de leur isolement ne sont souvent actifs qu'à l'état « naissant ».

a) La méthode classique de passages en série sur des étalements de la souche détectrice (sans filtration).

b) La culture simultanée en eau peptonée de la souche lysogène et de la souche détectrice. L'expérience a montré que les quantités ensemencées devaient être différentes pour les deux souches et que les proportions les plus favorables étaient : quatre fois plus de bactéries de la souche détectrice que de la souche lysogène. On laisse cinq heures à l'étuve puis dix-huit heures à la glacière. Dans les cas favorables une lyse parfois totale se produit. C'est seulement dans ce cas que la méthode est utilisable (ce qui est fréquent). Mais alors on gagne du temps, car le titre est d'emblée assez élevé (3×10^8 ph/cm³ environ).

Si la seconde méthode échoue, on se contente de la première qui réussit le plus souvent, mais qui est lente.

3° *Entraînement de mutants des phages, isolés sur d'autres souches.*

On a, dans le temps précédent, isolé 14 phages avec lesquels on a préparé des lysats de titre élevé (ce titre étant pris sur la souche détectrice). Certains de ces lysats ont produit alors quelques plages sur des souches pour lesquelles on n'avait pas détecté de phages par les opérations précédentes. Ces plages étaient donc dues à des phages mutants (et on a vérifié que leur gamme d'activité était différente). Ces phages mutants, au nombre de 12, ont été obtenus également à un titre élevé par entraînement sur la souche correspondante.

4° *Sélection des phages intéressants.* — On avait finalement isolé, par cette méthode, 26 phages nouveaux différents, à partir de 53 souches non identifiables par les phages classiques. On a ajouté à ces phages les deux mutants 55 A et 70 A, provenant des phages anciens 55 et 70 (voir plus haut).

Ces 28 phages, amenés à un titre élevé, ont été alors essayés à diverses dilutions sur les 53 souches non identifiables ainsi que sur des souches identifiables par les phages classiques.

15 phages ont été éliminés à la suite de cette épreuve, soit parce que trop peu spécifiques (agissant sur presque toutes les souches), soit parce que faisant double emploi avec d'autres. Dans ce second cas, entre plusieurs phages ayant à peu près la même gamme d'action, on a choisi celui qui permettait d'identifier le plus grand nombre de souches.

CLASSEMENT DES PHAGES NOUVEAUX.

Les 13 phages retenus ont été essayés finalement sur 75 souches non identifiables par les phages classiques : les 53 qui avaient servi à leur isolement et 22 autres isolées dans un service hospitalier, et que nous devons à l'obligeance de Pillet.

Ces phages ont été répartis en trois séries, en fonction de leur spécificité, de leurs parentés et du nombre de souches qu'ils permettaient d'identifier.

Première série. — Phages 735 A, 735 G et 735 E.

Ils sont remarquables par plusieurs caractères :

a) *Leur grande spécificité* qui dépasse même celle des phages classiques les plus spécifiques (ceux des trois premiers groupes). Nous n'avons pas rencontré jusqu'ici de souche attaquée à la fois par eux et par d'autres phages.

b) *Leur parenté étroite.* Ils sont souvent associés entre eux par 2 ou par 3 dans l'attaque d'une souche.

c) *Leur gamme d'action assez étendue* : ils ont permis d'identifier 30 souches non identifiables par les phages classiques sur 75.

A cause de ces trois caractères, nous les considérons comme constituant un nouveau groupe de phages caractérisant un nouveau groupe de souches. Bien plus, toutes les souches sensibles à ces phages ont présenté les mêmes réactions sérologiques, elles étaient agglutinées par les sérums des types I, 4 et 8, d'après Pillet.

Deuxième série. — Phages 838 A, 838 C, 838 D, 847 B, 841.

a) *Ils sont moins spécifiques*, car ils attaquent des souches sensibles également à divers phages classiques, avec prédilection pour les souches du groupe I.

En effet, des phages de cette série ont attaqué :

Dans le groupe I	5 souches	sur 8.
Dans le groupe II	1 —	sur 3.
Dans le groupe III	0 —	sur 8.
Dans le groupe IV	4 —	sur 9.

Enfin, deux souches sensibles à la fois à des phages des séries II et IV, l'étaient aussi à des phages de cette deuxième série.

b) Leur parenté est montrée par l'association fréquente de plusieurs d'entre eux. De plus ils ont une parenté avec le phage 31 B, qui s'est trouvé quatre fois associé à des phages de cette série.

Notons que les souches sensibles à 847 B sont rares ; il n'a permis d'identifier que 3 souches, dont une à lui seul, une en association avec 838 A et une autre en association avec 838 D.

c) *Leur gamme d'action* est assez étendue, mais moins que celle des phages de la série précédente. Ils ont été actifs sur 24 souches insensibles aux phages classiques (sur 75) et sur 12 souches sensibles à ces phages (sur 30).

Troisième série. — Phages 380, 734, 735 F, 70 A, 55 A.

a) *Ils sont très spécifiques.* — Les souches sensibles à l'un d'entre eux le sont rarement aux phages d'autres séries (nouveaux ou classiques); les seuls cas observés sont : 70 A, une fois associé à 847 B et 55 A, une fois associé à 841.

b) *Ils n'ont pas de parenté entre eux.*

c) *Leur gamme d'action est très étroite.* — Les phages 380, 735 F et 70 A n'ont identifié qu'une souche chacun; seul 55 A en a identifié deux.

Avec les 13 nouveaux phages, on a pu identifier 60 souches non identifiées par les phages classiques sur 75, soit 80 % (21 sur 28 de notre collection; 20 sur 25 envoyées de Londres, et 19 sur 22 isolées dans un hôpital parisien).

Sur ces 60 souches identifiées avec les phages nouveaux :

Sont sensibles aux phages nouveaux de la première série . . .	30
Sont sensibles aux phages nouveaux de la deuxième série. . .	24
Sont sensibles aux phages nouveaux de la troisième série . . .	6

Pour avoir une idée du progrès réalisé par l'adjonction des phages nouveaux aux phages classiques, nous rappelons que sur 455 souches de notre collection prises au hasard, 30 étaient non identifiées par les phages classiques. Sur 28 de ces souches on a essayé les nouveaux phages : le nombre des souches non identifiées a été réduit à 7 (1,5 %) au lieu de 28 (6 %).

DISCUSSION.

1° Nous savons que, au point de vue de l'étendue de leur gamme d'action, les phages des staphylocoques se classent en deux grandes catégories :

a) Des phages à gamme d'action très étendue. Ils sont de ce fait peu intéressants pour l'identification des souches. Dans cette catégorie, il faut encore distinguer deux sortes de phages. Ceux de la première sorte peuvent lyser un très grand nombre de bactéries à très faible concentration. Ils sont actifs sur un très grand nombre de souches (80 % environ). Tels sont les phages E. W, S₃K. de notre collection, φ 119, φ 130, φ 131, φ 200, que nous devons à l'obligeance de Boulgakow. Ils ont été isolés en général de l'eau d'égout.

Les phages de la seconde sorte ont un pouvoir lytique moindre, ils sont actifs sur un nombre de souches moins grand. Tels sont le phage 68 actif sur 57 % des souches (Wahl et Lapeyre-Mensignac [5]), les phages 155 et 166 (Wallmark [6]), actifs sur environ 42 % des souches. Le phage 68 semble provenir d'une souche lysogène. Nous ignorons la provenance des phages de

Wallmark. Tous les trois appartiennent, selon R. E. O. Williams et Rippon au même groupe sérologique [7].

b) Des phages à gamme d'action limitée, plus ou moins étroite, parmi lesquels sont choisis les phages d'identification. Ils sont tous issus de souches lysogènes.

2° Nous avons vu que les souches de staphylocoques lysogènes sont généralement insensibles (comme dans le cas des salmonelles) à l'infection par le phage qu'elles produisent. Mais, à certains moments, la proportion de bactéries spontanément lysées devient soudain très grande.

On peut faire plusieurs hypothèses à ce sujet : accroissement du taux des bactéries productrices de phages ; mutation de bactéries lysogènes (résistantes au phage produit par elles) en bactéries sensibles à ce phage ; mutation de phages, qui deviendraient actifs sur les bactéries lysogènes. Il est possible que, suivant les cas, l'un ou l'autre phénomène se produise. Mais la mutation de phages paraît rare, car dans la plupart des cas les phages extraits du milieu où la culture s'est lysée spontanément ne produisent pas de plages sur la souche prise à une phase où elle ne présente pas de lyse spontanée apparente.

3° Les constatations faites plus haut sont en faveur d'une parenté entre les phages à gamme d'action étroite (phages de la deuxième catégorie) produits par une souche lysogène de staphylocoques et les phages de la même catégorie actifs sur cette souche.

4° Le parallélisme entre les réactions aux phages et les réactions sérologiques, que nous avons montré avec Pillet pour les groupes de souches I, II et III [4] a été observé également pour un nouveau groupe de souches, identifiables par les phages nouveaux.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Les souches de staphylocoques étudiées, insensibles aux phages classiques, l'étaient aussi à la plupart des autres phages utilisés parfois par les auteurs et à tous les phages isolés par nous à partir de souches lysogènes sensibles aux phages classiques.

2° A partir d'un grand nombre de ces souches, qui étaient lysogènes, nous avons isolé des phages, actifs respectivement sur un plus ou moins grand nombre d'entre elles.

3° Il résulte de ce qui précède que certains, au moins, des phages produits par une souche de staphylocoques (ceux qui appartiennent à la catégorie des phages à gamme d'action étroite) sont apparentés aux phages de même catégorie actifs sur cette souche.

4° Nous avons indiqué une technique pour l'isolement et la sélection de phages nouveaux.

5° 13 phages nouveaux se répartissant en trois séries ont été finalement retenus. La première série comprend 3 phages très spécifiques, capables d'identifier un nombre important de souches non identifiables par les phages classiques et caractérisant un nouveau groupe de souches, groupe ayant non seulement des réactions définies aux phages, mais aussi des réactions sérologiques caractéristiques (ce qui montre une fois de plus le parallélisme entre les réactions aux phages et les réactions sérologiques). Les phages de la seconde série sont moins spécifiques, ceux de la troisième ne peuvent identifier chacun, qu'un petit nombre de souches.

6° L'adjonction des phages nouveaux aux phages classiques a réduit le nombre des souches non identifiables à 1,5 % au lieu de 6 %.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. T. FISK. *J. inf. Dis.*, 1942, **71**, 153.
- [2] J. PILLET, J. CALMELS, B. ORTA, G. CHABANIER. *VI^e Congrès international de Microbiologie*. Rome, septembre 1953.
- [3] P. ROUNTREE et E. F. THOMSON. *Lancet*, 1949, 501.
- [4] R. WAHL, J. FOUACE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 542.
- [5] R. WAHL, P. LAPEYRE-MENSIENAC. *Ces Annales*, 1950, **78**, 765.
- [6] G. WALLMARK, G. LAURELL. *Acta path. microbiol. scand.*, 1952, **30**, 109.
- [7] R. E. O. WILLIAMS, J. E. RIPPON. *J. Hyg.*, 1952, **50**, 320.
- [8] H. WILLIAMS SMITH. *J. Hyg.*, 1948, **46**, 74 et 84.

A PROPOS DES TRAVAUX DE BRESLER SUR LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES SOUS HAUTES PRESSIONS

par G.-P. TALWAR (*) et M. MACHEBOEUF † (**).

(Institut Pasteur.)

Bresler, depuis 1947 [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7], affirme réaliser la synthèse des protéines à partir de leur hydrolysât enzymatique sous des pressions élevées. Il laisse l'enzyme agir sur la protéine pendant quelques heures. Ensuite il soumet le mélange de la protéine partiellement digérée et de l'enzyme à une pression de l'ordre de 6 000 kg/cm² pendant huit à vingt heures. A la sortie de la presse, il observe, dit-il, une diminution de l'azote aminé libre (mesuré par les méthodes de Van Slyke et de Soerensen). Une telle synthèse aurait été observée par Bresler pour la gélatine, les globulines du sérum et d'autres protéines en présence de trypsine. Bresler aurait aussi observé que l'amidon dégradé par l'action de l'amylase pourrait reformer un produit semblable à l'amidon initial, par la pression hydrostatique en présence de l'amylase. Selon cet auteur, la présence de l'enzyme serait nécessaire pour que la synthèse évolue, car un échantillon comprimé en présence de l'enzyme dénaturé ne montrerait pas des résultats semblables.

Ces travaux ont suscité un grand intérêt. Nous avons entrepris maintes séries d'expériences; mais nous n'avons jamais observé la synthèse de protéine ou d'amidon.

Examinons les conditions de travail de Bresler. Sa technique est identique à celle que nous utilisons. Il remplit une ampoule de verre avec le liquide en étude. Cette ampoule se termine par un tube capillaire. Il place cette ampoule dans un sac de caoutchouc (1) rempli également avec le liquide en étude. Le sac est fermé, puis placé dans une chambre d'expérience entourée par de l'eau distillée qui transmet la pression acquise par des moyens hydrauliques.

(*) Boursier de l'Institut National d'Hygiène.

(**) Manuscrit reçu le 25 octobre 1953.

(1) Bresler n'a pas précisé la nature du caoutchouc qu'il emploie.

Pour remplir l'ampoule, Bresler fait le vide dans une cloche afin de faire pénétrer le liquide dans l'ampoule lorsque l'air rentre dans la cloche.

Nous avons aussi effectué quelques essais en utilisant cette technique de remplissage, mais les résultats étaient identiques à ceux obtenus en remplissant l'ampoule sans l'aide du vide.

Nous avons déjà exposé [8] les résultats que nous avons observés en travaillant avec l'amidon. Les hautes pressions (6 000 kg/cm², 8 000 kg/cm² sous lesquelles travaille Bresler) arrêtent l'action hydrolytique de l'amylase, mais aucune synthèse ne s'effectue, car le pouvoir réducteur reste ce qu'il était au moment de la mise en presse. Vingt-cinq essais ont été faits avec différentes concentrations de l'enzyme et en faisant varier d'autres facteurs : pH, durée de la compression, valeur de la pression, etc. Jamais nous n'avons observé la synthèse de l'amidon. Nous avons essayé de reproduire enfin toutes les conditions, jusqu'au dernier détail, sous lesquelles Bresler travaille. Nous avons même refroidi la presse avec de la neige carbonique afin d'empêcher, par le froid, toute évolution éventuelle des réactions enzymatiques pendant et après la décompression. Mais jamais nous n'avons pu déceler la moindre trace de synthèse. Selon les affirmations de Bresler, on aurait obtenu dans ces conditions 80 à 100 p. 100 de produit resynthétisé. Nos méthodes de dosage auraient permis de déceler des proportions de synthèses, même si elles avaient été considérablement plus petites.

N'ayant observé aucune synthèse d'amidon sous les pressions hydrostatiques élevées, nous avons tenté la synthèse des protéines mentionnées par Bresler.

Les premières séries d'essais furent conduites sur la gélatine. Une solution à 1 p. 100 fut préparée dans le tampon borate (0,2 M en ions borate), dont le pH fut 9,15 (pH le plus favorable mentionné par Bresler). La trypsine était une préparation purifiée (2). Une concentration de 0,05 p. 100 fut employée. On laissa agir l'enzyme sur le substrat pendant deux heures et vingt-deux minutes, à 37° C. Une partie du mélange fut alors soumise à 6 000 kg/cm² pendant environ quatorze heures. L'azote aminé libre fut dosé par la méthode de van Slyke [9] dans le mélange comprimé et dans le témoin non comprimé. La figure 1 résume les résultats. Il n'y a pas eu de synthèse.

Nos résultats sont identiques à ceux que Machebœuf et coll. avaient obtenus en 1950 [10].

(2) Trypsine commerciale dite « pure » de « British Drug House » que nous avons traitée par de l'eau acidulée à pH 3 par HCl. On éliminait la partie insoluble, puis on soumettait à la dialyse contre de l'eau bidistillée pendant plusieurs jours. L'eau était enfin évaporée par sublimation de glace (lyophilisation).

D'ailleurs il existe plusieurs autres travaux [11, 12] où des systèmes enzymatiques ont également été soumis à de hautes pressions de l'ordre que Bresler emploie. Jamais on n'a observé la synthèse de la protéine utilisée comme substrat. On observe au contraire une dénaturation de l'enzyme qui augmente avec la durée de compression. Ceci concorde bien avec nos résultats antérieurs [8]. Voyons ce que Bresler dit à ce propos. Dans ses quatre premières publications [1, 2, 3, 4], il n'a jamais fait

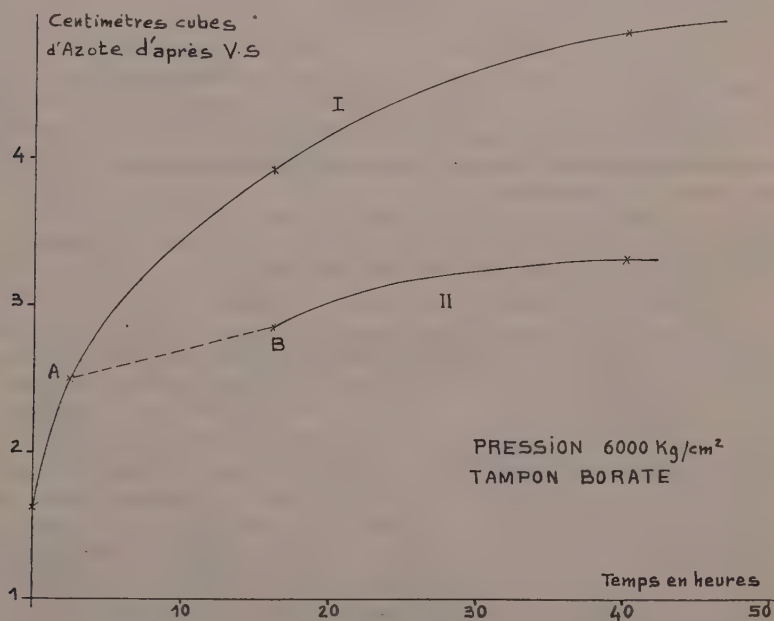


FIG. 1.

allusion à une inactivation éventuelle de l'enzyme qui pourrait survenir pendant la compression à 5 000-10 000 kg/cm². Au contraire, en 1947, il écrit [2] qu'une même quantité de trypsine retiendrait son activité même après plusieurs séjours sous de hautes pressions de l'ordre de 5 000 kg/cm². La concentration de la trypsine employée était 0,033 p. 100. Le pH de la solution était 8,5 à 9,2 (3), tampon borate 0,1 M. A une solution de gélatine connue 1-4 p. 100, Bresler ajoutait la trypsine dans une

(3) Selon Kunitz et Northrop [13] le maximum de stabilité de la trypsine serait au voisinage de pH 5. Curl et Jansen (1950) ont observé que la dénaturation de la trypsine par pression est plus prononcée au-dessus de pH 4.

proportion de 1/30. Le mélange était laissé à 37° C à la pression atmosphérique pendant quelques heures (hydrolyse). Ensuite le mélange était soumis à 5 000 kg/cm² pour une durée variable entre huit et vingt heures. Au moment de la décompression, la presse était refroidie par de la neige carbonique. Le mélange congelé sorti de la presse contiendrait, dit Bresler, un produit tout semblable à la gélatine initiale. Si une partie de ce mélange est maintenue à la pression atmosphérique, l'hydrolyse tryptique recommence et avec la même vitesse qu'auparavant ; à un moment donné, on peut remettre une fraction de ce mélange dans la presse et on obtiendra de nouveau une synthèse de la gélatine à partir de ses produits d'hydrolyse. Le mélange synthétisé la deuxième fois recommencera à s'hydrolyser une fois encore s'il est ramené à la pression atmosphérique. Selon Bresler, ce processus pourrait se répéter plusieurs fois avec la même quantité d'enzyme ajoutée au début de l'expérience. Ceci laisse entendre que les pressions élevées n'exercent aucun rôle destructif sur l'activité de l'enzyme. Nos observations sont contraires, ainsi que celles de plusieurs autres travailleurs [11, 12, 14, 15, 16, 17].

Dans une très récente publication [7], Bresler reconnaît enfin que les enzymes cristallisés subissent une dénaturation sous des pressions élevées. Il affirme cependant qu'une solution de glucose à 20 p. 100 suffirait à empêcher cette dénaturation de l'enzyme. Nous avons donc fait une expérience dans de telles conditions. Une solution de cristalbumine de sérum de cheval est amenée, par un peu de soude, au pH 8,4. Ensuite elle est chauffée à l'ébullition pendant dix minutes pour dénaturer la protéine. Dans ces conditions d'alcalinité, la sérumalbumine dénaturée ne précipite pas. A cette solution, on ajoute de la trypsine (concentration finale : 0,09 p. 100) en tampon borate (0,2 M) pH 8,46. Un mélange semblable est réalisé dans un milieu contenant 20 p. 100 de glucose. Les deux mélanges sont abandonnés à l'étuve (37° C) pendant deux heures. Ensuite une partie de chacun est soumise à 6 000 kg/cm² pendant seize heures trente minutes. Les mesures sont faites sur des échantillons de 2 ml auxquels on ajoute 2 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100. On incube pendant une heure à 37° C, puis on centrifuge. La densité optique du surnageant (4) est mesurée au photomètre Beckmann pour 2 800 Å. Une solution d'acide trichloracétique de même teneur sert comme témoin (zéro pour les mesures). Voici les résultats obtenus :

On voit tout d'abord que l'hydrolyse enzymatique dans le mélange contenant le glucose est plus lente que dans le mélange où l'on n'a pas ajouté de glucose.

(4) Le surnageant est dilué quatre fois par de l'eau bidistillée.

NUMÉRO DE L'OBSERVATION	TEMPS ÉCoulé depuis l'addition de l'enzyme	LOG DENSITÉ OPTIQUE à 2 800 Å dans le mélange ne contenant pas de glucose (E 1 cm 280 mμ)		LOG DENSITÉ OPTIQUE du mélange contenant 20 p. 100 de glucose (E 1 cm 280 mμ)	
		Echantillon maintenu à la pression normale	Echantillon comprimé 6 000 kg/cm ² pendant 16 h. 30	Echantillon à la pression normale	Echantillon comprimé 6 000 kg/cm ² pendant 16 h. 30
1	3 min.	0,259		0,307	
2	119 min.	0,750	Mise en presse.	0,542	Mise en presse.
3	18 h. 30	0,925	Sortie 0,788.	0,760	Sortie 0,715.
4	22 h. 45		0,835		0,795

Dans les deux cas, il y a un ralentissement de l'hydrolyse pendant la compression, mais aucune synthèse n'est décelable à la sortie de la presse, même en présence de glucose.

Selon Bresler (1952), la concentration de l'enzyme nécessaire pour la synthèse serait infime : 0,0005 p. 100. Mais nous savons que les pressions élevées exercent un rôle dénaturant; nous pouvons donc nous demander si la présence de l'enzyme actif est obligatoire et si les pressions élevées seules ne suffisent pas à produire la soi-disant synthèse. Nous avons effectivement constaté que la pression hydrostatique fait accroître la viscosité des solutions de gélatine [18]. A la sortie de la presse, la solution possède une viscosité beaucoup plus élevée que le témoin resté à la pression atmosphérique. Quand l'enzyme est, en outre, présent dans la solution, la viscosité commence à baisser progressivement suivant une courbe dont l'allure est semblable à celle de l'hydrolyse de la gélatine dans les conditions normales de pression atmosphérique. Si une partie de ce mélange est remise en presse, on observera de nouveau un accroissement de la viscosité. Après décompression, la viscosité commencera de nouveau à baisser. Ce processus peut se répéter maintes fois. On sera frappé par la similitude entre ces résultats et ceux donnés par Bresler pour une de ses expériences. Bresler a travaillé avec le même substrat (gélatine) et il emploie dans cette expérience la viscosité pour apprécier la synthèse de ces substrats. Mais, contrairement à ce qu'affirme Bresler, nous n'observons pas la moindre diminution de l'azote aminé libre au cours de ces processus.

Nous avons, enfin, également observé qu'un accroissement de viscosité de la gélatine sous des pressions élevées peut se pro-

duire sans que l'enzyme actif soit présent [18] (5). On doit aussi remarquer que la viscosité baisse un peu quand la solution pressée est laissée à la pression atmosphérique. Or, cette baisse de viscosité ressemble à la baisse qui intervient quand l'enzyme présent dans un mélange pressé reprend son action hydrolytique. En somme, dans cette expérience, il n'y avait pas du tout d'enzyme actif et, cependant, nous avons obtenu par compression :

1° Une augmentation de viscosité de la gélatine ;

2° Une courbe de viscosité se confondant avec celle obtenue en présence d'enzyme actif.

On a l'impression que les expériences de Bresler sont analogues. C'est seulement dans ses conclusions qu'il a dépassé le cadre de ses observations. L'augmentation de viscosité que l'on observe ne correspond pas à une synthèse peptidique de la gélatine. Car cette augmentation se fait sans que l'enzyme actif soit présent dans la solution; il n'y a rien d'étonnant à ce que Bresler effectue sa « synthèse » avec une concentration initiale de 0,0005 p. 100 seulement de trypsine (1952). Et pourtant, dans la discussion théorique de ses travaux, Bresler admet la présence obligatoire d'enzyme pour pouvoir réverser le sens de la réaction.

RÔLE DU TAMPON.

Dans ses travaux, Bresler [3] assigne un rôle particulièrement important à la nature du tampon. Selon lui, ΔV (changement de volume lors de l'hydrolyse de la protéine) aura un signe positif ou négatif selon le tampon qu'on emploiera. Dans un tampon borate 0,2 M, pH 9 $\Delta V = 9,5$ ml/mol de la protéine. Dans un tampon carbonate 0,1 M, pH 10,2 $\Delta V = 12$ ml/mol.

Pour le tampon phosphate 0,1 M $\Delta V = 0$ et dans l'eau pure $\Delta V = -12,5$ ml/mol. Or, selon lui, la pression hydrostatique produira la synthèse seulement si les solutions sont en tampon borate ou carbonate. Dans le tampon phosphate, la pression n'aura aucun effet et si la solution de protéine et d'enzyme est dans l'eau pure, la pression produit juste l'effet contraire, c'est-à-dire une accélération de l'hydrolyse. Nous ne discuterons pas pour l'instant ces arguments fallacieux (voir plus loin). Voyons ce que donnent comme résultats des expériences conduites par nous dans les différents milieux tamponnés, mentionnés par Bresler.

Les trois expériences (exprimées par les figures 2, 3, 4) furent faites avec de la gélatine comme substrat (concentration 1 p. 100). La première expérience (fig. 2) est conduite dans le tampon borate (0,2 M), pH 7,6 ; la seconde dans le tampon phosphate

(5) Un travail portant plus spécialement sur la viscosité des solutions de gélatine après compression doit faire l'objet d'un mémoire indépendant (G. F. Talwar).

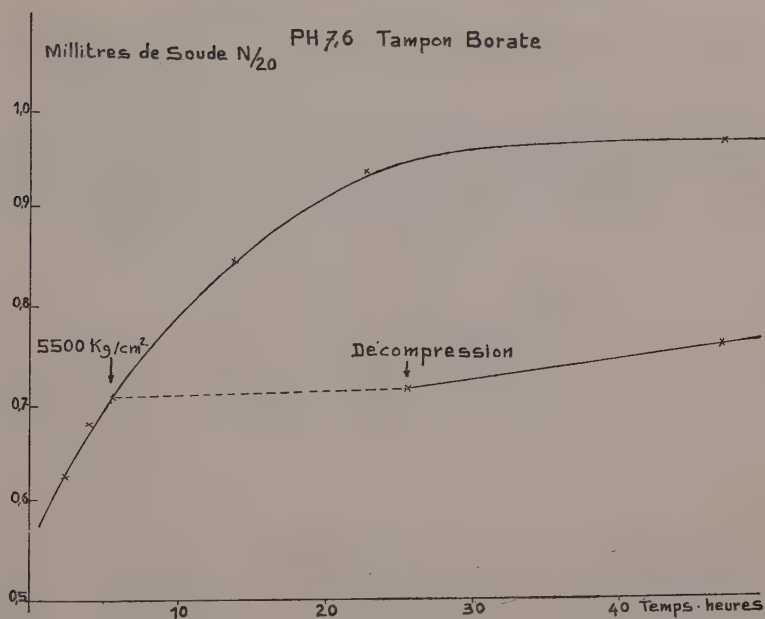


FIG. 2.

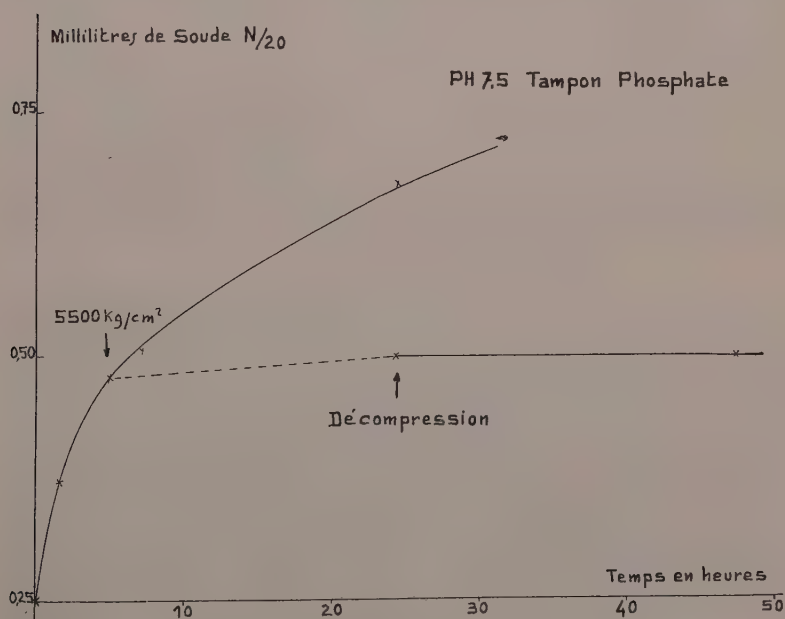


FIG. 3.

(M/15) pH $7,5 \pm 0,1$ et la troisième dans l'eau pure dont le pH au départ fut amené à 7,6 par une infime trace de soude. La trypsine (concentration 0,05 p. 100) est employée comme enzyme. L'évolution de l'hydrolyse est suivie par des dosages de groupement carboxyl libre en faisant les titrations en présence de formol selon Lévy [49]. Dans les trois cas, une partie du mélange est comprimée à 5 500 kg/cm² pendant environ dix-neuf heures. La température étant 37° C, comme on peut le voir par les figures 2,

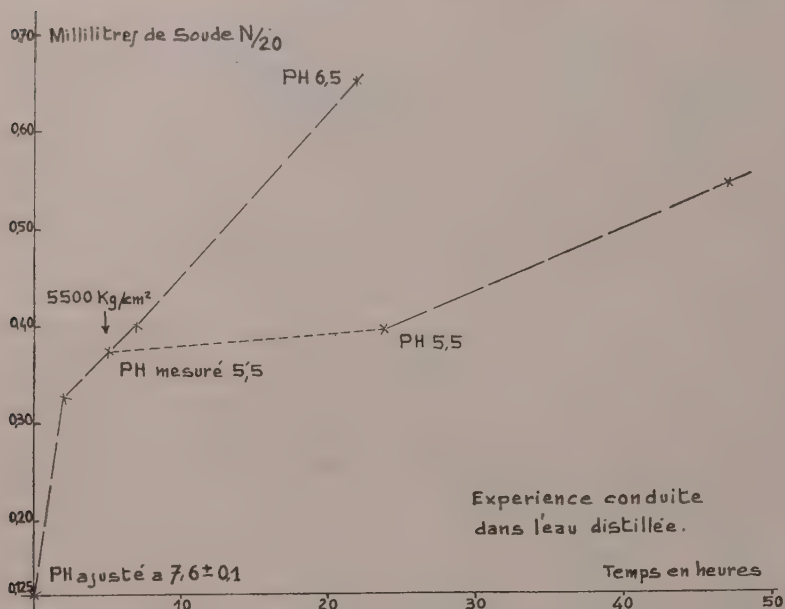


FIG. 4.

3, 4, nous n'observons dans aucun cas la synthèse de la gélatine hydrolysée. Les résultats obtenus dans les deux tampons borate et phosphate sont sensiblement pareils. Dans le tampon phosphate, il y a eu plus dénaturation de l'enzyme pendant la compression (l'hydrolyse n'évolue plus que très lentement après décompression). Dans le cas de l'expérience conduite dans l'eau (sans tampon), la pression a ralenti l'hydrolyse, comme dans le cas des expériences conduites dans les tampons borate et phosphate. Mais le pH ne reste pas constant (7,6 au départ ; 5,5 au moment de la mise en pression ; 6,5 après plusieurs heures à la pression atmosphérique et 5,5 à la sortie de la presse). Nous n'obtenons donc pas une courbe aussi régulière que pour les expériences effectuées dans des solutions tamponnées.

Quelques autres conditions précisées par Bresler pour obtenir, dit-il, la synthèse des protéines :

a) LA PRESSION. — Selon Bresler [4], la proportion de synthèse effectuée dépend de la pression. A 2 000 kg/cm² seulement, 20 p. 100 de la gélatine seront synthétisés et 80 p. 100 resteront à l'état hydrolysé. A 3 000 kg/cm², 28 p. 100 seront synthétisés ; à 5 000 kg/cm², 60 p. 100 et à 6 000 kg/cm², pratiquement toute la gélatine (98 p. 100) sera synthétisée.

Ces affirmations n'exigent guère de commentaires. Notre travail n'a jamais abouti à la synthèse, quelle que soit la pression appliquée et quel que soit le substrat (amidon, gélatine, albumine de sérum). Les pressions basses n'abiment pas ou abiment peu l'enzyme. Elles accélèrent l'action hydrolytique de l'enzyme [8]. Les pressions plus élevées ralentissent l'hydrolyse et dénaturent l'enzyme.

b) DURÉE DE LA COMPRESSION. — Sur ce point, Bresler est assez contradictoire. Dans son dernier travail (1952), il obtient, dit-il, des composés du même poids moléculaire que la protéine originale aussitôt que la haute pression (6 000 kg/cm²) est atteinte. De plus, il observe qu'aucune substance intermédiaire n'est formée dans la solution. En somme, quelques minutes, nécessaires pour monter la pression, suffisent pour réaliser entièrement la synthèse.

Dans un autre travail [4], il lui faut huit heures de pressage pour aboutir à la synthèse.

Dans d'autres travaux encore, il soumet des solutions à la pression pendant dix-huit à vingt heures [5].

DISCUSSION THÉORIQUE.

Voici les arguments que présente Bresler :

1° « Les hautes pressions favorisent la diminution du volume moléculaire. Or, dans un cristal d'alanine, Bernal a mesuré la distance entre les molécules qui est égale à 5,8 Å. La distance entre les unités d'alanine dans une chaîne peptidique n'est que 3,5 Å. Ainsi l'application de la haute pression à un mélange partiellement hydrolysé d'une protéine provoquerait la formation des chaînes peptidiques en présence de l'enzyme spécifique » (1947).

2° « Les chiffres pour ΔV calculés par Bresler et coll. [3] donnent une valeur positive pour l'hydrolyse d'une protéine dans les tampons carbonate et borate ; les produits d'hydrolyse occuperaient donc plus de volume que la protéine originale. Or, les pressions élevées tendent à défavoriser les réactions se faisant avec une augmentation de volume. »

L'argument n° 1 n'est pas très convaincant. Une simple diminution du volume d'un mélange est un trop faible motif pour que les liaisons peptidiques se forment toutes et que tout une molécule protéique en résulte. Remarquons que selon Bresler, il n'apparaîtrait pas de composé intermédiaire pendant la compression. Pour admettre cela, nous devrions envisager que sous pression, non seulement les liaisons peptidiques se font, mais aussi que l'arrangement des chaînes peptidiques dans l'ordre initial se réalise presque aussitôt. Bresler dit avoir identifié les protéines synthétisées par divers moyens, y compris des essais immunochimiques. Il les a toujours trouvées identiques aux protéines initiales. Les tests immunochimiques sont tellement sensibles que même une très minime différence dans la structure aurait été remarquée. Pourtant chacun sait (même Bresler) que les hautes pressions dénaturent la molécule protéique [11, 12, 20]. Des essais déjà très anciens de Machebœuf et coll. [21] sur l'anaphylaxie et nos essais propres sur la formation d'anticorps [22] ont même démontré l'apparition d'une nouvelle spécificité antigénique dans la molécule protéique pressée (voir [22]).

Le deuxième argument que Bresler fournit a aussi ses adversaires. Linderstrom-Lang et Jacobsen [23] ont réalisé des mesures de ΔV au cours de l'hydrolyse des liaisons peptidiques de protéines et de polypeptides. Ces auteurs ont toujours observé une valeur négative de ΔV pour tous les pH inférieurs à 10,5 environ. Or Bresler admet pour les mêmes pH une valeur positive pour ΔV .

RÉSUMÉ.

Bresler a affirmé pouvoir réaliser la synthèse de protéines en soumettant à de fortes pressions hydrauliques des solutions de produits d'hydrolyse partielle de protéines, en présence de protéase. Nous avons vainement tenté d'obtenir la synthèse affirmée par Bresler. Nous observons une augmentation de la viscosité, mais aucune formation de liaison peptidique nouvelle. Bien plus, l'augmentation de viscosité se produit même en l'absence d'enzyme. D'autre part, les pressions mises en œuvre par Bresler (5 000 à 6 000 kg/cm² à 37° C) provoquent une perte d'activité progressive irréversible des enzymes.

La nature du tampon et la présence dans la solution de substances étrangères (glucose, par exemple) ne protègent pas la trypsine et n'influent pas sur le sens des phénomènes observés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. E. BRESLER. *C. R. Acad. Sci. U. R. S. S.*, 1947, **55**, 141.
- [2] S. E. BRESLER et M. V. GLIKINA. *Biokhimiya*, 1947, **12**, 389.

- [3] S. E. BRESLER. *Izvest. Akad. Nauk. S. S. S. R. Ser. Fiz.*, 1948, **12**, 695.
- [4] S. E. BRESLER, G. V. SAMSONOV et N. A. SELEZNEVA. *Biokhimiya*, 1949, **14**, 524.
- [5] S. E. BRESLER, M. V. GLIKINA, KONINOV, N. A. SELEZNEVA et P. A. FINOGENOV. *Izvest. Akad. Nauk. S. S. S. R. Ser. Fiz.*, 1949, **13**, 392.
- [6] S. E. BRESLER, M. V. GLIKINA, N. A. SELEZNEVA et P. A. FINOGENOV. *Biokhimiya*, 1952, **17**, 44.
- [7] S. E. BRESLER et N. A. SELEZNEVA. *Doklad. Akad. Nauk. S. S. S. R.*, 1952, **84**, 1013.
- [8] G. P. TALWAR, E. BARBU, J. BASSET et M. MACHEBOEUF. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 1793.
- [9] D. D. VAN SLYKE. *J. biol. Chem.*, 1911, **19**, 185 et 1915, **23**, 407.
- [10] M. MACHEBOEUF, J. BASSET, E. BARBU, M. LE SAGET et G. NUNEZ. *Bull. Soc. Chim. France.*, 1951, **18**, 471, et *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 962.
- [11] L. CURL et E. JANSEN. *J. biol. Chem.*, 1950, **184**, 45 et **185**, 713.
- [12] J. E. MATHEWS, R. B. DOW et A. K. ANDERSON. *J. biol. Chem.*, 1940, **135**, 697.
- [13] M. J. KUNITZ et J. H. NORTHROP. *J. gen. Physiol.*, 1934, **17**, 591.
- [14] J. BASSET, M. LISBONNE et M. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1933, **196**, 1540.
- [15] J. BASSET et M. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1932, **195**, 1431.
- [16] M. MACHEBOEUF et J. BASSET. *Ergeb. Enzymforsch.*, 1934, **3**, 303.
- [17] M. MACHEBOEUF, J. BASSET et G. LEVY. *Ann. Physiol.*, 1933, **9**, 713.
- [18] G. P. TALWAR, J. BASSET et M. MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 393.
- [19] M. LÉVY. *J. biol. Chem.*, 1934, **105**, 157.
- [20] P. W. BRIDGEMAN. *J. biol. Chem.*, 1914, **19**, 511.
- [21] J. BASSET, M. MACHEBOEUF et J. J. PÉREZ. *C. R. Acad. Sci.*, 1935, **200**, 496.
- [22] G. P. TALWAR, M. MACHEBOEUF et J. BASSET. *XIIIth International Congress of pure and applied Chemistry*. Stockholm, 1953, *J. Coll. Sci.* (sous presse).
- [23] K. LINDERSTROM-LANG et C. F. JACOBSEN. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.*, 1941, **24**, 1 et 281.

INFLUENCE DES HAUTES PRESSIONS HYDROSTATIQUES SUR L'ACTION ENZYMATIQUE DE LA RIBONUCLÉASE (*)

par P. VIGNAIS et M. MACHEBOEUF †.

(*Institut Pasteur.*)

En 1947, Bresler [1, 2], s'appuyant sur le principe de Le Chatelier, rechercha l'action des hautes pressions hydrostatiques sur des protéases en présence de leur substrat.

Soumettant ces systèmes à des pressions de l'ordre de 6 000 atm., il affirma avoir pu déplacer l'équilibre enzymatique dans le sens de la synthèse. Il constatait, en effet, sur l'hydrolysats protéique après action de la pression :

- Une augmentation de la viscosité ;
- Une diminution des groupes aminés,
- Et même, à partir d'un hydrolysats ayant perdu sa spécificité antigénique, l'apparition, dans la substance synthétisée sous presse, de l'ancienne spécificité.

Mais l'hypothèse de départ ainsi que les critères sont contestables. En effet, pour que la pression puisse favoriser une synthèse, il faut que le produit occupe un volume plus faible que l'hydrolysats. Or, Linderstrom-Lang [3] a constaté une diminution de volume au cours de l'hydrolyse protéique. Toutefois Samsomov [4] pense que les conditions de pH et la nature du tampon sont des facteurs très importants et que parfois il serait possible d'avoir une contraction au cours de la synthèse. Mais, d'après cet auteur, ce dernier cas ne serait qu'une exception.

D'ailleurs, en solution aqueuse, dans des conditions physiologiques, toute molécule chargée subit une électrostriction de la part des dipôles d'eau. Or, cette électrostriction est plus forte pour les amino-acides que pour la protéine dont ils faisaient partie initialement.

De plus, les travaux expérimentaux de Bresler ont été repris récemment sans pouvoir être confirmés. Machebœuf et coll. [5] ont, en effet, analysé l'influence de la pression sur l'hydrolyse enzymatique des protéines. Se plaçant dans les conditions expé-

(*) Manuscrit reçu le 12 octobre 1953.

rimentales indiquées par Bresler, ils n'ont pas observé de synthèse protéique, mais simplement des modifications de viscosité comme il s'en produit indépendamment de toute action enzymatique lorsque l'on comprime des protéines ou de gros polypeptides. Signalons les recherches de Talwar, Barbu, Basset, Machebœuf [6] effectuées parallèlement à nos travaux sur la ribonucléase : ces auteurs ont cherché à vérifier d'autres conclusions de Bresler sur la synthèse de l'amidon en comprimant, en présence de l'amylase, les produits d'hydrolyse partielle. Les résultats ont été, là aussi, contraires aux affirmations de Bresler,

Dans tous les cas, l'hydrolyse continue à évoluer avec une vitesse plus ou moins grande suivant la pression.

Cette action des pressions élevées sur la vitesse des réactions enzymatiques a été étudiée du point de vue théorique par divers auteurs [7, 8, 9]. Laidler, en particulier, a montré que les facteurs les plus importants qui influent sur cette cinétique sont : la concentration du substrat mis en œuvre et la pression (des pressions trop élevées pouvant dénaturer irréversiblement certains enzymes).

Dans le système que nous avons étudié (acide ribonucléique de levure-ribonucléase), l'enzyme présente l'intérêt de rester très actif après avoir été soumis, même sans substrat, à des pressions de l'ordre de $12\,000\text{ kg/cm}^2$.

Nous avons montré précédemment [10] que l'acide ribonucléique de levure peut se polymériser sous l'effet des hautes pressions ; aussi tiendrons-nous compte de ce phénomène dans l'analyse du comportement, sous pression, du complexe enzyme-substrat.

Au cours de nos expériences, nous avons fait varier les facteurs suivants : pression, quantité d'enzyme mis en œuvre.

Utilisant la précipitation fractionnée par l'acide acétique [11], nous avons tenté de mettre en évidence l'influence de ces facteurs sur l'hydrolyse de grands et moyens polymères (1). La précipitation était effectuée sur des fractions aliquotes de solution nucléique à des stades différents de l'hydrolyse. Le précipité est recueilli par centrifugation ; on le dissout dans de l'acide sulfurique concentré et sa teneur en phosphore est estimée par dosage colorimétrique [12].

Première expérience. — Nous mettons en solution dans un tampon phthalate 0,2 M de pH 5,6 un acide nucléique de levure (échantillon N₃) à la concentration de 7,5 mg/ml et de la ribonucléase purifiée à la concentration de 1,25 microgr/ml.

(1) Rappelons que nous désignons arbitrairement par grands polymères (G. P.) la fraction d'acide nucléique précipitant par 1 vol. d'acide acétique et par moyens polymères (M. P.) la fraction précipitant entre 1 et 20 vol. d'acide acétique.

Cette solution est laissée à la température de 37° C pendant trente minutes. On la divise ensuite en deux parties :

La première partie est subdivisée en trois fractions soumises respectivement aux pressions de 14 000, 6 000 et 2 000 kg/cm² pendant cent vingt minutes à 37° C ;

L'autre partie sert de témoin, elle reste à la pression atmosphérique à 37° C.

Le tableau I indique les quantités de phosphore dosé dans les précipités obtenus par action de l'acide acétique sur les solutions pressées et témoin (tableau I, fig. 1 et 2).

TABLEAU I.

	TEMPS écoulé depuis le début de l'hydrolyse	Témoin à la pression atm.		Solution comprimée à 14.000 Kg/cm ²		Solution comprimée à 6.000 Kg/cm ²		Solution comprimée à 2.000 Kg/cm ²	
		H.P.	M.P.	H.P.	M.P.	H.P.	M.P.	H.P.	M.P.
	0 minute	82	378						
mise en pression	30 minutes	29	237						
décompression	120 minutes	20	143	43,5	232	32	208	30	128
	130 minutes	—	—	40,5	229	29	201	29	129
	240 minutes	19	123	30	170	25	141		

Les résultats obtenus permettent les conclusions suivantes :

1° L'action d'une pression de 14 000 kg/cm² provoque une augmentation des hauts polymères. Le chiffre de phosphore passe, en effet, de 29 microgrammes pour l'échantillon témoin à 43,5 microgrammes pour l'échantillon qui a été soumis à la compression ; mais ce phénomène a déjà été constaté en l'absence de ribonucléase [10].

Quant aux moyens polymères, leur proportion, avant et après compression, reste sensiblement identique.

D'ailleurs l'hydrolyse reprend dès que l'échantillon est ramené à la pression atmosphérique.

2° A 6 000 kg/cm², le taux en phosphore des hauts polymères est passé de 29 à 32 microgrammes. Là aussi, se serait donc produite une polymérisation banale non enzymatique. Par contre, la proportion des moyens polymères a sensiblement diminué puisqu'elle est passée de 237 à 208 microgrammes de phosphore. L'hydrolyse des moyens polymères subit par conséquent une inhibition moins grande à 6 000 kg/cm² qu'à 14 000 kg/cm².

3° A 2 000 kg/cm², il n'y a pas non plus de variation sensible des hauts polymères ; mais nous notons une baisse très nette des moyens polymères (de 237 à 128 microgrammes de phosphore).

Ainsi, l'hydrolyse enzymatique des moyens polymères se poursuit sous des pressions inférieures à $6\,000\text{ kg/cm}^2$. Cette hydrolyse est d'autant plus rapide que la pression est plus basse. Notons qu'à $2\,000\text{ kg/cm}^2$ elle évolue plus vite que pour le

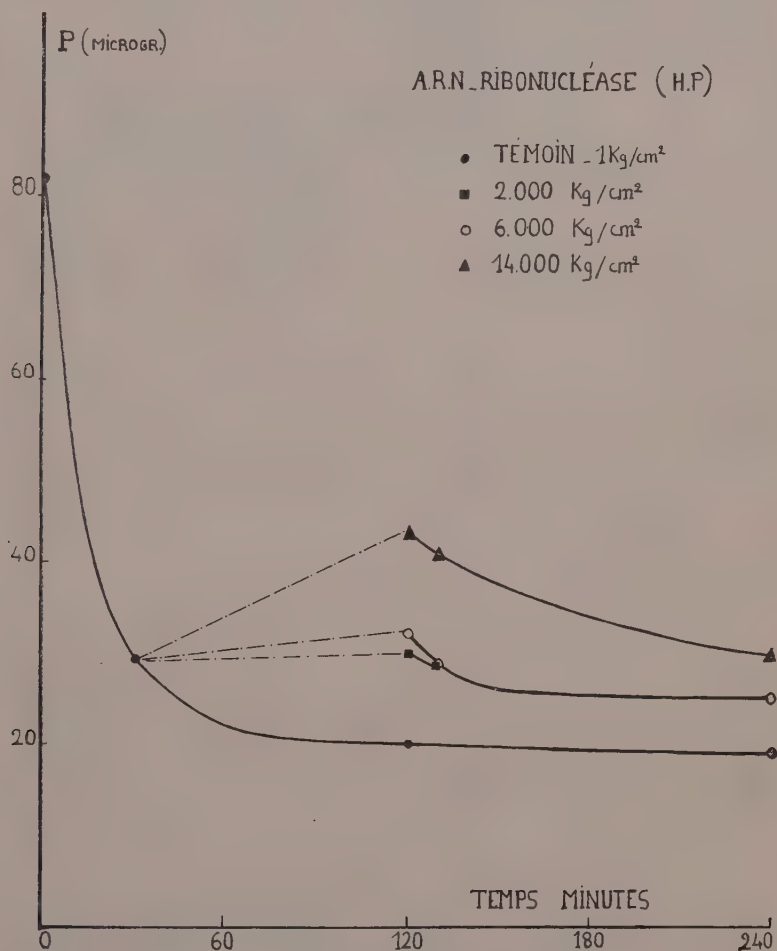


FIG. 1.

témoin (143 microgrammes de phosphore dans les moyens polymères de l'échantillon pressé et 128 dans ceux de l'échantillon témoin).

Toutefois, après retour à la pression atmosphérique, l'hydrolyse de ces moyens polymères n'évolue plus ; elle a déjà atteint

une limite qui est du même ordre de grandeur que celle atteinte par l'hydrolyse d'une solution nucléique témoin laissée à la pression atmosphérique.

Pour compléter ces premiers résultats, il était intéressant d'opérer avec des quantités plus faibles d'enzyme.

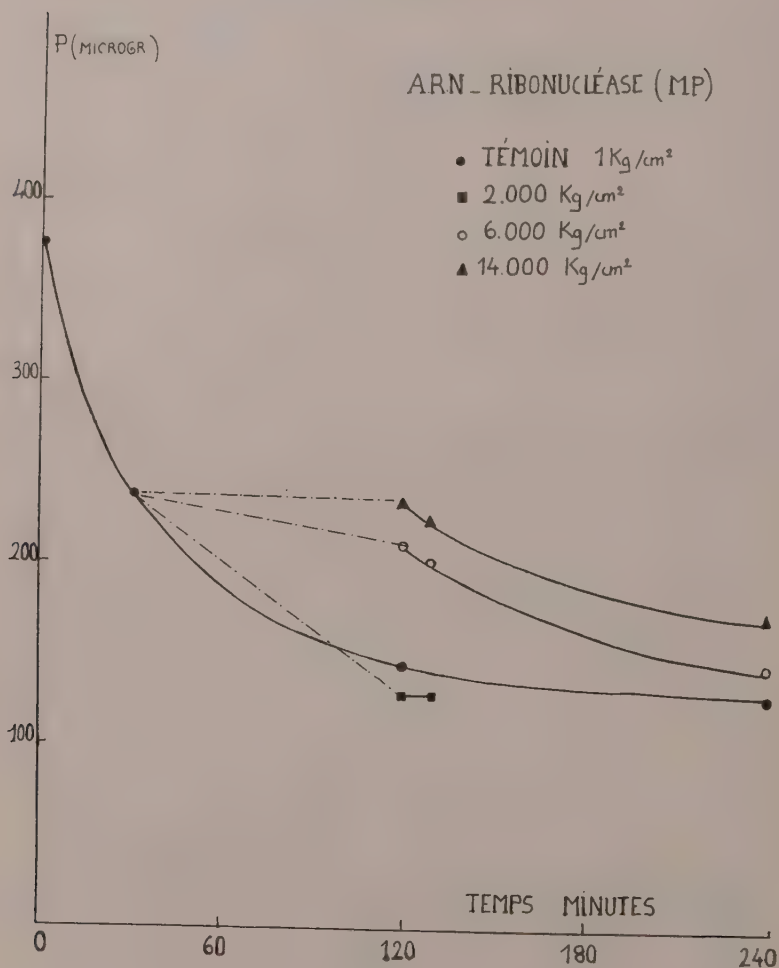


FIG. 2.

Deuxième expérience. — Le protocole est identique à celui de l'expérience précédente. Seule varie la proportion de ribonucléase : nous l'utilisons ici à la concentration de 0,125 microgr/ml.

L'hydrolyse évolue moins vite que précédemment, la quantité

d'enzyme étant plus faible. Il nous a été ainsi possible de comprimer la solution nucléique à un stade plus précoce de

TABLEAU II.

	TEMPS	Témoin resté à la pression atm.		Solution comprimée à 6.000 Kg/cm ²	
		H.P.	M.P.	H.P.	M.P.
	0 minute	82	378	42,5	264,5
mise en pression	30 minutes	41	339		
décompression	105 minutes	25	255		

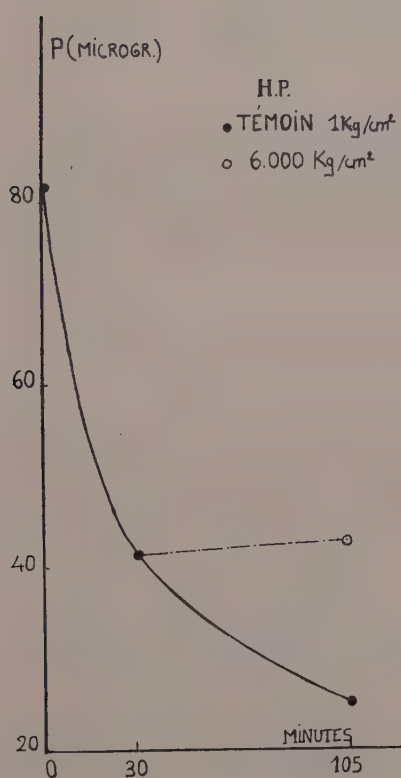


FIG. 3.

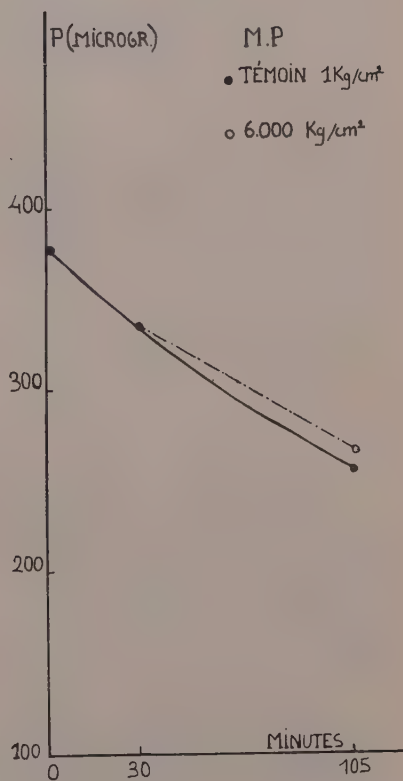


FIG. 4.

l'hydrolyse. La pression, mise en œuvre, était de 6 000 kg/cm².

En comparant les échantillons pressé et témoin (tableau II, fig. 3 et 4), nous constatons qu'il n'y a pas de changement notable dans

la quantité des hauts polymères. Par contre, dans les moyens polymères, la teneur en phosphore passe de 339 à 264,5 microgrammes. Si l'on se rapporte à l'expérience précédente, on peut conclure que l'hydrolyse sous pression des moyens polymères est d'autant plus importante que la solution a été comprimée à un stade plus précoce de son hydrolyse.

Troisième expérience. — Nous avons, cette fois, utilisé une concentration en ribonucléase relativement élevée : 50 microgr/ml.

L'hydrolyse est alors très rapide et, à la huitième minute, au moment de la compression, elle est presque arrivée à sa limite. La solution d'A. R. N. a été comprimée à 14 000 kg/cm² pendant soixante minutes.

On note, dans ces conditions, une augmentation dans la proportion des hauts polymères et une hydrolyse des moyens polymères (voir tableau III et fig. 5 et 6).

TABLEAU III.

	Temps écoulé depuis le début de l'hydrolyse	Témoin resté à la pression atm.		Solution comprimée à 14. 000 Kg/cm ²	
		H.P.	M.P.	H.P.	M.P.
	0 minute	82	378	30	90
mise en pression	8 minutes	23,5	97		
sortie de presse	60 minutes	20,5	86		

RÉSUMÉ.

De ces recherches nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Des pressions très élevées inhibent l'action de la ribonucléase sur l'acide ribonucléique de levure. Mais cette inhibition ne dure que le temps de la compression. Dès que celle-ci est relâchée, l'hydrolyse reprend sa marche.

2° Sous des pressions de 6 000 kg/cm² ou de 2 000 kg/cm², l'hydrolyse enzymatique se poursuit de façon notable pour les moyens polymères, mais reste inhibée pour les hauts polymères.

Sous 2 000 kg/cm², l'hydrolyse des moyens polymères est nettement accélérée et dépasse même la vitesse d'hydrolyse à la pression atmosphérique ; toutefois, la limite atteinte dans les deux cas reste du même ordre de grandeur.

En somme, de l'ensemble de ces faits se dégagent deux points essentiels :

1° Dans le cas du système A. R. N.-ribonucléase, la pression ne favorise pas le déplacement de l'équilibre enzymatique vers la synthèse.

2° Dans une solution polydispersée d'A. R. N. soumise à la

compression (en particulier pour $2\,000\text{ kg/cm}^2$), les moyens polymères présentent une nette sensibilité à l'hydrolyse enzymatique contrairement aux hauts polymères. Or, fait curieux, ceux-ci, à la pression atmosphérique, sont attaqués plus rapidement (voir mémoire antérieur [11]).

Deux interprétations de ce phénomène sont possibles : les hauts

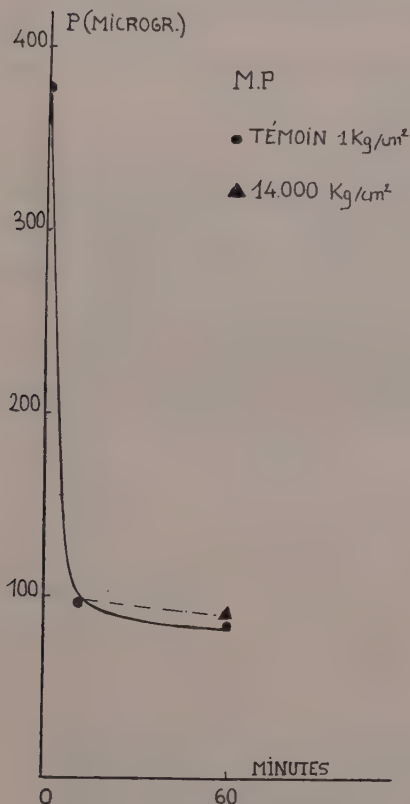


FIG. 5.

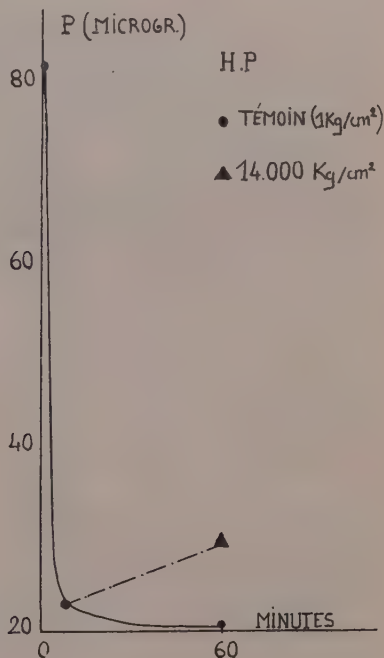


FIG. 6.

polymères peuvent, soit jouer un rôle d'inhibition compétitive dans l'hydrolyse des moyens polymères, soit, au cours d'une étape intermédiaire de leur dégradation, libérer des polynucleotides de même poids moléculaire que les moyens polymères présents dans la solution polydispersée initiale. Ce dernier processus expliquerait l'accumulation des moyens polymères et le ralentissement de l'hydrolyse. Il rendrait compte, d'autre part, des résultats fournis par les hautes pressions : la dégradation

enzymatique des hauts polymères étant stoppée, l'hydrolyse des moyens polymères s'effectue alors normalement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. E. BRESLER et V. L. GLIKINA. *Biochimia*, 1947, **12**, 389.
- [2] S. E. BRESLER, V. L. GLIKINA, A. P. KONIKOV, N. A. SELEZNEVA et P. A. FINOGENOV. *Izvest Akad. Nauk, S. S. S. R. Ser. Fiz.*, 1949, **13**, 392.
- [3] K. LINDERSTROM-LANG et C. F. JACOBSEN. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg (série chimique)*, 1941, **24**, 1.
- [4] G. V. SAMSOMOV. *Biochimia*, 1949, **14**, 113.
- [5] M. MACHEBOEUF, J. BASSET, E. BARBU, M. LE SAGET et G. NUNEZ. *Bull. Soc. Chim.*, 1951, **18**, 471.
- [6] G. TALWAR, E. BARBU, J. BASSET et M. MACHEBOEUF. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 1649 et 1793.
- [7] H. EYRING et J. MAGEE. *J. Cell comp. Phys.*, 1942, **20**, 169.
- [8] F. JOHNSON, H. EYRING et R. W. WILLIAMS. *J. Cell comp. Phys.*, 1942, **20**, 247.
- [9] K. LAIDLER. *Arch. Biochem.*, 1951, **30**, 226.
- [10] P. VIGNAIS, M. MACHEBOEUF et J. BASSET. *Ces Annales* (sous presse).
- [11] P. VIGNAIS. *Ces Annales*, 1953, **85**, 64.
- [12] M. MACHEBOEUF et J. DELSAL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 116.

ÉTUDE PAR ULTRACENTRIFUGATION DU SÉRUM DE CHEVAL

par P. SLIZEWICZ (*).

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

La technique d'ultracentrifugation a été surtout employée, depuis sa mise au point par Svedberg, pour étudier des préparations protidiques diverses, vérifier leur homogénéité ou déterminer leur poids moléculaire. Une autre application très intéressante s'est développée ces dernières années à la suite des travaux de Gofman et coll. [1, 2, 3] : la séparation, à partir de sérums humains, de fractions lipoprotéiques en relation avec l'athérosclérose. Lewis et coll. [4] ont étendu cette méthode aux sérums d'autres animaux.

Résumons brièvement la méthode employée par ces derniers auteurs : après modification de la densité du sérum par addition d'un sel, on le centrifuge dans une ultracentrifugeuse préparative. On prélève, la centrifugation terminée, au sommet de chaque tube, 1 cm³ de liquide. Ce liquide a été débarrassé des substances dont la densité est restée supérieure à celle du milieu, il s'est au contraire enrichi en substances dont la densité est inférieure à celle du milieu.

Soumis maintenant à une ultracentrifugation analytique, on peut suivre le rapprochement de l'axe de rotation (plus brièvement nous disons la centripétence) des substances en solution et déterminer — par analogie avec la constante de sédimentation — une constante de centripétence qui sera caractéristique, étant donnée la densité du milieu, de la substance étudiée.

Avant d'appliquer telle qu'elle vient d'être décrite cette méthode au sérum de cheval, nous avons voulu voir comment se comportaient les différentes fractions qu'y révèle l'ultracentrifugation analytique quand on modifie la densité du milieu.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Dans le présent travail, nous avons utilisé l'ultracentrifugeuse du Service des Virus de l'Institut Pasteur, qui a déjà été

(*) Manuscrit reçu le 27 novembre 1953.

décrite [5]. On peut l'utiliser, soit comme ultracentrifugeuse préparative et dans ce cas elle permet de centrifuger 45 cm³ de liquide répartis dans six tubes en matière plastique, soit comme ultracentrifugeuse analytique. Son système optique permet alors l'enregistrement direct sur la plaque photographique de la courbe donnant la variation du gradient d'indice de réfraction en fonction de la distance à l'axe de rotation. Nous avons effectué généralement les centrifugations à la vitesse de 720 t/s, cette vitesse étant atteinte en une heure d'accélération environ. On prend quatre à six clichés au cours de chaque ultracentrifugation analytique. La constante de sédimentation est calculée par la formule de Svedberg :

$$S = \frac{2(x_2 - x_1)}{x_2 + x_1} \frac{1}{4\pi^2 N^2} \frac{1}{t_2 - t_1}$$

x_2 et x_1 distance en centimètres à l'axe de rotation de la frontière considérée aux temps t_2 et t_1 exprimés en secondes, N nombre de tours par seconde. Etant donnée la technique utilisée, on peut commettre une erreur maximum de 10 p. 100 sur la valeur de S ainsi calculée [6]. D'autre part, on ramène la valeur ainsi trouvée

à ce qu'elle serait à 20° C en la multipliant par le facteur $\frac{\eta_{\eta}}{\eta_{20}}$,

rapport des viscosités de l'eau à 0° C, température de l'expérience, et à 20° C (1). Il est donc important de connaître aussi exactement que possible la température du liquide centrifugé au moment où sont pris les clichés. En effet, malgré un vide très poussé (1/1 000 mm de mercure), la température du rotor s'élève assez sensiblement. Au début de la centrifugation, la température est celle du laboratoire ; en fin d'expérience, on détermine la température du liquide centrifugé à l'aide d'un petit thermomètre à animaux.

Au cours de nos expériences, il nous a semblé que l'on pouvait assez exactement considérer l'élévation de la température du rotor comme proportionnelle à la durée de la centrifugation. Ainsi nous avons pu, étant données les températures au début et en fin d'expérience, déterminer par intrapolation la température moyenne du milieu entre deux clichés consécutifs. Cette température nous donnait la valeur du coefficient à employer pour corriger la valeur de S calculée entre ces deux clichés. Nous n'avons pas tenu compte des variations des volumes spécifiques partiels des différentes protéines en fonction de la température qui sont pratiquement négligeables.

(1) La viscosité des solutions salines, même concentrées, est assez peu différente de celle de l'eau. A 25° C une solution de bromure de potassium 3 M a une viscosité de 0,969 par rapport à celle de l'eau pure à la même température [7].

I. — ULTRACENTRIFUGATION DU SÉRUM DE CHEVAL PUR.

a) ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE. — L'ultracentrifugation analytique du sérum de cheval pur dans l'ultracentrifugeuse crée un gradient d'indice trop élevé qui dévie les rayons lumineux hors des limites de la plaque photographique. La zone où l'indice de réfraction varie est, par ailleurs, trop étendue, ne permettant pas une séparation convenable des différentes fractions étant données les dimensions réduites de la cellule d'ultracentrifugation. Nous avons donc été amené à diluer (2) le sérum de cheval avec quatre fois son volume d'eau physiologique. Dans ces condi-

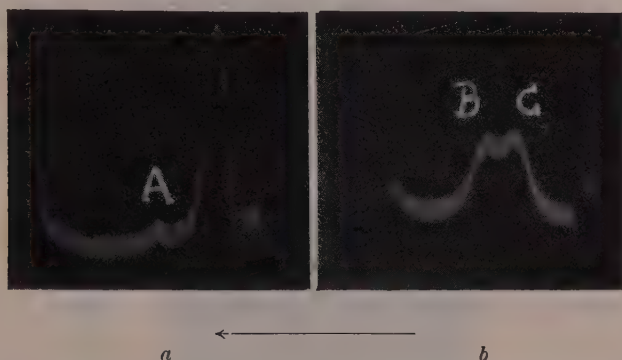


FIG. 1. — *a*, cliché pris au moment où la centrifugeuse atteint sa pleine vitesse. *b*, cliché pris soixante-treize minutes après. La flèche indique la direction de la force centrifuge.

tions, on obtient le diagramme d'ultracentrifugation ci-dessus (fig. 1). La figure 1 *a* montre la fraction A de constante de sédimentation, 16,8 unités Svedberg. Le cliché 1 *b* montre la résolution en deux fractions (B et C) du pic déjà bien visible sur le cliché 1 *a* : les constantes de sédimentation des deux fractions sont respectivement 6,8 et 4,0.

b) ULTRACENTRIFUGATION PRÉPARATIVE. — La centrifugation pendant trois heures à 720 t/s dans le rotor préparatif du sérum de cheval pur permet de recueillir au sommet des tubes de centrifugation un liquide très nettement appauvri en ses différents constituants, ainsi que le montre l'électrophorèse sur papier (fig. 2).

(2) Remarquons que selon Mac Farlane [8], cette dilution s'accompagne d'une modification du diagramme d'ultracentrifugation dans le sens d'une augmentation apparente des globulines.

Il y a disparition des globulines γ , appauvrissement en globulines α et β ; seule la tache des albumines est bien nette.

L'ultracentrifugation analytique de ce liquide ne révèle pratiquement plus qu'une seule fraction protéique dont la constante de sédimentation est égale à 4,5 unités Svedberg (fig. 3).

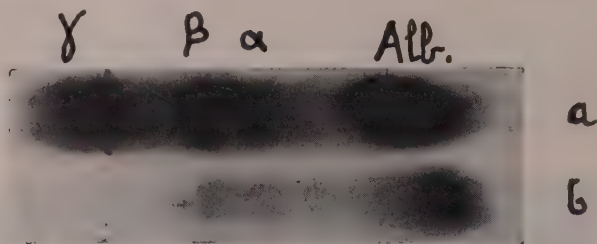


FIG. 2. — Electrophorèse sur papier dans le tampon véronal pH 8,6. *a*, sérum de cheval normal. *b*, prélèvement fait au sommet des tubes après centrifugation.



FIG. 3. — Cliché pris quatre-vingt-dix minutes après que la centrifugeuse a atteint sa pleine vitesse. La flèche indique la direction de la force centrifuge.

II. — ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE EN MILIEUX DE DENSITÉ CROISSANTE.

Si l'on substitue progressivement comme diluant à l'eau physiologique, une solution de bromure de potassium à 31 p. 100 ($d = 1,25$), on pourra suivre l'influence de la densité du milieu sur la sédimentation des différentes fractions. Nos résultats sont résumés dans le tableau I.

On peut porter ces résultats sur un graphique avec en abscisses

TABLEAU I.

Diluant pour 1 cm ³ de sérum	Cliché	Fractions		
		A	B	C
Eau physiologique 4 cm ³	Fig. 1	16,8 \pm 1	6,8 \pm 0,5	4,0 \pm 0,3
Solution de bromure de potassium 1 cm ³ Eau physiologique 3 cm ³	Fig. 5 a	15,1 \pm 1	6,5 \pm 0,5	3,3 \pm 0,3
Solution de bromure de potassium 2 cm ³ Eau physiologique 3 cm ³	Fig. 5 b	15,3 \pm 1	5,6 \pm 0,5	3,2 \pm 0,3
Solution de bromure de potassium 3 cm ³ Eau physiologique 1 cm ³	Fig. 5 c	11,8 \pm 1	3,8 \pm 0,3	
Solution de bromure de potassium 4 cm ³	Fig. 5 d	10,7 \pm 1	4,2 \pm 0,3	

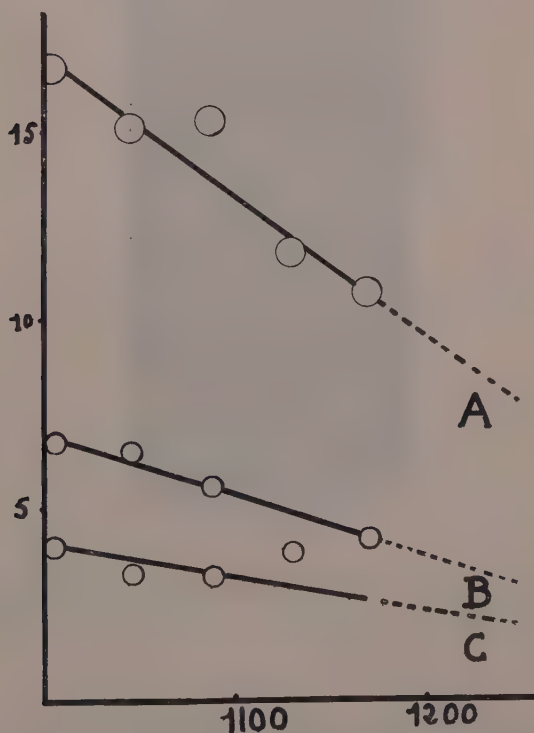


FIG. 4. — Variation des constantes de sédimentation des différentes fractions en fonction de la densité du milieu. En abscisses, densité du milieu. En ordonnées, constantes de sédimentation.

la densité du milieu et en ordonnées les valeurs des constantes de sédimentation (fig. 4).

On voit que lorsque la densité dépasse 1 100, on ne distingue plus que deux fractions. La dissymétrie du deuxième

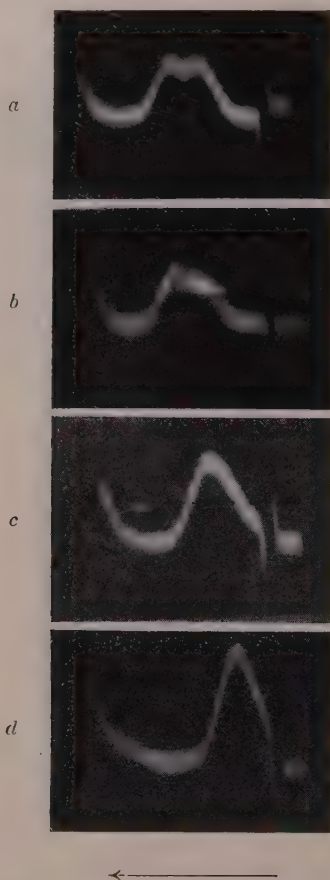


FIG. 5. — Clichés d'ultracentrifugation, pris quatre-vingt-cinq minutes après que la centrifugeuse a atteint sa pleine vitesse, dans des milieux de densité croissante (à ce moment la fraction A a complètement sédimenté). La flèche indique la direction de la force centrifuge.

pic, seul représenté sur les clichés *c* et *d* de la figure 5, suggère cependant que la fraction qui sédimente avec une constante de sédimentation 3,7-3,9 comprend l'ensemble des fractions B et C.

III. — SÉPARATION PAR ULTRACENTRIFUGATION DE FRACTIONS PROTÉIQUES DE DENSITÉ INFÉRIEURE A 1,25.

On voit par extrapolation sur la figure 4 que, si la densité du milieu est égale à 1,25, la constante de sédimentation des différentes fractions est toujours positive. Donc, après avoir amené la densité du sérum à cette valeur, une ultracentrifugation préparative devait nous permettre de recueillir, au sommet des tubes, un liquide appauvri de la majeure partie des protéines et peut-être enrichi d'une fraction plus légère, que la dilution nécessaire pour les centrifugations analytiques précédentes rendait invisible.

Nous avons dissous 15,5 g de bromure de potassium dans

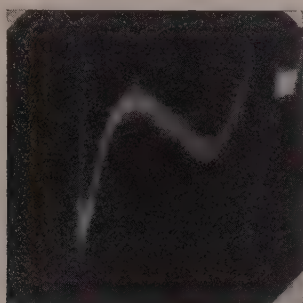


FIG. 6. — Cliché pris au moment où la centrifugeuse atteint la vitesse de 720 t/seconde. La flèche indique la direction de la force centrifuge.

50 cm³ de sérum de cheval et centrifugé ce liquide dans le rotor préparatif pendant trois heures à 720 t/s. On prélève 1 cm³ au sommet de chacun des tubes puis, afin d'obtenir une concentration suffisante en fractions de faible densité, on effectue sur ce prélèvement une deuxième ultracentrifugation préparative. On recueille alors au sommet des tubes un liquide qui donne, dans l'ultracentrifugeuse analytique, le diagramme de la figure 6, sur lequel on distingue deux fractions dont les constantes de centripétence sont 28 et 4,7 unités Svedberg.

Ainsi l'ultracentrifugation préparative se révèle utile pour séparer à partir du sérum de cheval des fractions protéiques uniquement en fonction de leur densité. L'ultracentrifugation analytique permet de caractériser dans le sérum de cheval trois fractions. Cela semble peu vis-à-vis des résultats de l'électrophorèse, de la précipitation par les sels ou de l'immunologie. Cepen-

dant, cette technique pourrait permettre de suivre l'action progressive d'un agent précipitant ou dénaturant aux environs des limites de son action.

RÉSUMÉ.

Nous avons étudié les modifications des diagrammes d'ultracentrifugation du sérum de cheval quand on augmente la densité du milieu par addition d'un sel.

Après deux ultracentrifugations préparatives, nous avons pu caractériser deux fractions protéiques dont la densité est inférieure à 1,25. Nous nous proposons d'étudier les rapports de ces fractions avec les cénapses acido-précipitables de Machebœuf.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. W. GOFMAN, F. T. LINDGREN et H. ELLIOTT. *J. biol. Chem.*, 1949, **179**, 973.
- [2] J. W. GOFMAN, F. T. LINDGREN, H. ELLIOTT, W. MANTZ, J. HEWITT, B. STRISOWER, V. HERRING et T. P. LYON. *Science*, 1950, **111**, 166.
- [3] F. T. LINDGREN, H. A. ELLIOTT et J. W. GOFMAN. *J. phys. coll. Chem.*, 1951, **55**, 80.
- [4] L. A. LEWIS, A. A. GREEN et I. H. PAGE. *Amer. J. Physiol.*, 1953, **171**, 391.
- [5] G. BARSKI, J. MAURIN, G. WIELGOSZ et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1951, **81**, 9.
- [6] P. SLIZEWICZ. *Ces Annales*, 1953, **85**, 503.
- [7] *Tables annuelles des constantes et données numériques*, 1937, **6**, 7.
- [8] A. S. MAC FARLANE. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 407.

**ACTIVITÉ ANTITOXIQUE DU SÉRUM DES ANIMAUX
AYANT REÇU PENDANT QUELQUES MOIS
DES INJECTIONS DE TOXINE *SEPTICUM*
OU D'ANATOXINE *HISTOLYTICUM*,
PUIS DES INJECTIONS SIMULTANÉES
DE TOXINE *SEPTICUM* ET D'ANATOXINE *HISTOLYTICUM***

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY (*).

(Institut Pasteur.)

Dans l'article précédent, nous avons indiqué l'allure de la courbe immunitaire de quatre chevaux ayant reçu des injections d'anatoxine histolytique pendant trois ou quatre mois (première immunisation), puis des injections de toxine *septicum* pendant un temps plus long (deuxième immunisation). La première immunisation n'avait déclenché chez ces animaux qu'une faible émission d'antitoxine anti-*histolyticum* α . Les sérums prélevés pendant la deuxième immunisation manifestaient des propriétés anti-*septicum* très nettes et présentaient la particularité d'être capables de supprimer l'action léthale d'une quantité plus grande de toxine histolytique que les sérums recueillis à la fin de la première immunisation. Ces faits ont été mis en évidence en déterminant, par le procédé international, le titre antitoxique de tous les sérums successivement étudiés (titrages sur souris blanches de 17 à 20 g, injections intraveineuses).

Voici quelques-uns des résultats les plus frappants que nous ayons enregistrés. A la fin de la première immunisation, le sérum d'un cheval titre 25 à 30 unités internationales anti-*histolyticum* (U. I. anti-hist.); cinquante-sept jours après avoir commencé la deuxième immunisation, le sérum du cheval titre 75 à 100 unités anti-*septicum* (U. I. anti-sept.), 100 à 150 U. I. anti-hist. Quatorze mois après le début de la deuxième immunisation, le cheval fournit du sérum dont les titres sont les suivants : 250 à 300 U. I. anti-sept., 600 à 800 U. I. anti-hist.; la très forte activité anti-*histolyticum* α de ce sérum est véritablement étonnante dans l'état actuel de nos connaissances.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} octobre 1953.

Nous avons recherché si les sérums récoltés pendant la deuxième immunisation possédaient encore une activité anti-*histolyticum* importante lorsqu'on venait de les additionner de toxine *septicum* dans le but de supprimer la plus grande partie de leur pouvoir anti-*septicum*. En expérimentant avec des sérums titrant plus de 40 U. I. anti-hist. et plus de 80 U. I. anti-sept., nous avons enregistré les résultats suivants : le titre anti-*histolyticum* de différents sérums est devenu inférieur à 3 U. I. anti-hist. quand nous les avons mis en présence de la dose de toxine *septicum* qui diminuait de 83 à 90 p. 100 leur titre anti-*septicum* ; d'autres sérums titraient 10 à 30 U. I. anti-hist. quand on leur ajoutait la dose de toxine *septicum* qui supprimait 85 à 95 p. 100 de leur pouvoir anti-*septicum* [1]. De tels résultats indiquent nettement que les propriétés antiléthales des sérums examinés ne sont pas additives. Rappelons que le procédé de titrage mis en œuvre dans ces recherches permet de constater que les propriétés antiléthales du mélange que l'on prépare en ajoutant un sérum anti-*septicum* spécifique à un sérum anti-*histolyticum* spécifique sont additives [2].

A la suite de ces observations, nous avons titré des sérums provenant d'animaux ayant reçu, au début, des injections d'antigènes *septicum* ou d'anatoxine *histolyticum*, ultérieurement, des *inoculations simultanées de toxine septicum et d'anatoxine histolyticum*. L'activité antitoxique de tous les sérums successivement prélevés est évaluée par le procédé international. Plusieurs de ces immunsérums sont en outre titrés en présence de deux toxines différentes, la première étant ajoutée au sérum trente minutes avant la deuxième pour déterminer si cette première toxine affaiblit beaucoup l'activité des sérums vis-à-vis de la deuxième. Les principes de ces deux procédés de titrage sont indiqués dans nos précédents articles [1, 2].

I. — SÉRUMS DES CHEVAUX PRÉPARÉS D'ABORD CONTRE LES ANTIGÈNES SEPTICUM PUIS, A LA FOIS, CONTRE LES ANTIGÈNES SEPTICUM ET HISTOLYTICUM.

Un de nos chevaux (cheval 197) reçoit trois injections sous-cutanées d'anatoxine *septicum*, puis des injections de toxine *septicum* (première immunisation) ; cinquante jours après la première inoculation, son sérum titre 150 à 200 U. I. anti-sept. Le sérum prélevé le quatrième mois après le début de l'immunisation possède les propriétés suivantes : il titre seulement 50 U. I. anti-sept. ; d'autre part, il faut l'employer à la dose de 0,15 ml pour neutraliser deux doses minima mortelles de toxine histolytique. A partir de ce moment, le cheval reçoit plusieurs injections de doses croissantes d'anatoxine histolytique puis, simultanément,

mais à des endroits différents de l'encolure, des injections de toxine *septicum* et d'anatoxine *histolyticum* (deuxième immunisation); quarante-cinq jours après la première injection d'anatoxine histolytique, le sérum du cheval titre 200 U. I. anti-sept., 75 à 100 U. I. anti-hist. Pendant les mois suivants, l'immunité anti-*septicum* ne s'accroît pas malgré les inoculations d'antigène; le titre anti-*histolyticum* atteint, mais ne dépasse pas, 150 U. I. Le sérum prélevé trente-neuf mois après avoir commencé la deuxième immunisation titre 60 à 70 U. I. anti-sept., 100 à 110 U. I. anti-hist. (titrages selon la méthode internationale). L'observation suivante montre que ce sérum exerce une forte activité anti-*histolyticum* en présence d'une quantité importante de toxine *septicum*; en effet, lorsque nous l'additionnons de la dose de toxine *septicum* qui inhibe 60 unités anti-*septicum*, il titre ensuite 40 U. I. anti-hist., ainsi qu'on peut le voir en consultant la cinquième colonne du tableau suivant (le sérum 197 diffère par conséquent très nettement des sérums 384 que nous avons

Activité antitoxique du sérum de différents animaux ayant reçu, au début, des injections d'antigènes *septicum* ou *histolyticum*, puis, des injections simultanées d'antigènes *septicum* et *histolyticum*.

Numéro des Sérums	Titre anti- <i>septicum</i> déterminé en présence		Titre anti- <i>histolyticum</i> déterminé en présence	
	d'une seule toxine : sept.	de deux toxines : hist. et sept.	d'une seule toxine : hist.	de deux toxines : sept. et hist.
Première immunisation : injections d'antigènes <i>septicum</i> Deuxième immunisation : injections simultanées d'antigènes <i>septicum</i> et <i>histolyticum</i>				
197 "39 mois"	60 - 70	5 - 10... (100 hist.) 50 - 60... (60 hist.)	100 - 110	40 [60 sept.] 40 - 50... [30 sept.]
Première immunisation : injections d'antigènes <i>histolyticum</i> Deuxième immunisation : injections simultanées d'antigènes <i>histolyticum</i> et <i>septicum</i>				
19 "6 mois 1/2"	120	5 - 10... (115 hist.)	120	5 - 10... [10 sept.]
19 "24 mois"	140	35 (200 hist.) 80 (140 hist.)	200 - 225	30 - 40... [20 sept.]
39 "4 mois"	50	10 (60 hist.)	60 - 70	30 - 35 .. [45 sept.]
39 "18 mois"	75 - 80	60 - 70 .. (70 hist.)	80	40 - 50... [70 sept.]

Sept., *septicum*; hist., *histolyticum*.

Entre guillemets : temps écoulé entre le début de la deuxième immunisation et le prélèvement de chaque sérum noté dans ce tableau.

Entre parenthèses : nombre d'unités anti-*histolyticum*, par ml de sérum, saturées de toxine histolytique avant d'évaluer, en présence de toxine vibron septique, l'activité anti-*septicum* du mélange obtenu.

Entre crochets : nombre d'unités anti-*septicum*, par ml de sérum, saturées de toxine vibron septique avant d'évaluer, en présence de toxine histolytique, l'activité anti-*histolyticum* du mélange obtenu.

mentionnés dans le tableau I de l'article précédent ; rappelons que ces immunosérums 384 sont respectivement prélevés vingt et trente mois après avoir injecté de la toxine *septicum* au cheval 384 et qu'ils perdent leur forte activité anti-*histolyticum* a lorsqu'on les met en présence d'une quantité importante de toxine *septicum*).

Lorsque le sérum 197 est additionné d'une forte quantité de toxine histolytique, puis titré, on constate que son activité anti-*septicum* dans ces conditions est très faible (troisième colonne du tableau). Les propriétés antitoxiques *in vivo* de ce sérum ne sont donc pas encore totalement additives bien que l'animal donneur soit immunisé simultanément et depuis longtemps contre les antigènes de *Cl. septicum* et de *Cl. histolyticum*.

II. — SÉRUMS DE BOVINS PRÉPARÉS

D'ABORD CONTRE LES ANTIGÈNES HISTOLYTICUM, PUIS, A LA FOIS,
CONTRE LES ANTIGÈNES HISTOLYTICUM ET SEPTICUM.

Pendant la première immunisation, on fait à chaque animal uniquement des injections d'anatoxine *histolyticum* ; pendant la deuxième immunisation, on lui injecte à la fois, mais en des régions différentes de l'encolure, de l'anatoxine histolytique et des antigènes *septicum*.

Dans la deuxième colonne du tableau précédent, nous indiquons les titres anti-*septicum* et, dans la quatrième, les titres anti-*histolyticum* de plusieurs sérums titrés selon la méthode internationale et prélevés à des dates différentes aux bovins 19 et 39 pendant la deuxième immunisation. Dans la troisième colonne du tableau, nous notons le titre anti-*septicum* que ces sérums possèdent encore lorsque 87 à 90 p. 100 de leur activité anti-*histolyticum* sont supprimés par une dose appropriée de toxine histolytique ; dans la cinquième, on peut voir le titre anti-*histolyticum* des sérums préalablement additionnés de toxine *septicum*.

Exemples : Le bovin 19 reçoit, pendant soixante-dix jours, des injections d'une anatoxine *histolyticum* excellente ; et, pourtant, la septième semaine de l'immunisation, le sérum titre seulement 2 à 4 unités anti-*histolyticum* et, la dixième semaine, moins de 2 unités. La deuxième immunisation est alors commencée ; du sérum est prélevé fréquemment pour les dosages : le sérum récolté six mois et demi après le début de cette immunisation titre, d'après la méthode internationale, 120 U. I. anti-hist., 120 U. I. anti-sept. D'après les dosages effectués en présence de 2 toxines, ce sérum ne titre que 5 à 10 U. I. anti-sept. lorsqu'il est préalablement additionné de la quantité de toxine histolytique qui sature 115 U. I. anti-hist., c'est-à-dire 95 p. 100 de l'activité anti-histolytique du sérum. Lorsqu'une autre portion du même sérum est additionnée de la quantité de toxine *septicum* qui

sature 110 U. I. anti-sept. (soit 91 p. 100 de l'activité anti-septicum), le sérum ne titre alors que 5 à 10 U. I. anti-hist. Ce sérum ne semble donc contenir qu'une faible quantité d'antitoxines nettement indépendantes, c'est-à-dire d'antitoxines à affinité monovalente.

Examinons à présent les résultats des titrages du sérum 19 prélevé *vingt-quatre mois* après le début de la deuxième immunisation. D'après la méthode internationale, il titre 140 U. I. anti-sept., 200 à 225 U. I. anti-hist. Quand le sérum est mis en contact avec 2 toxines, nous obtenons ceci :

a) Lorsque nous saturons de toxine histolytique 200 U. I. anti-hist. de ce sérum, le sérum titre ensuite 35 U. I. anti-sept. ; b) Si nous saturons de toxine vibrion septique 120 U. I. anti-sept. de ce sérum (soit 85 p. 100 de l'activité anti-septicum), le sérum titre alors 30 à 40 U. I. anti-hist. D'après ces résultats, le sérum prélevé vingt-quatre mois après le début de la deuxième immunisation contient une proportion plus grande d'antitoxines distinctes que le sérum récolté dix-huit mois plus tôt. Il semble que des anticorps anti-septicum et anti-histolyticum isolés se constituent finalement pendant la longue période où il est fait à l'animal en expérience des injections simultanées d'antigènes septicum et histolyticum.

La même déduction se dégage des résultats que nous avons notés en titrant différents sérums prélevés au bovin 39. Cet animal a reçu des injections d'anatoxine histolytique pendant cinq mois et demi ; à la fin de cette première immunisation, son sérum titrait, d'après la méthode internationale, 60 à 70 U. I. anti-hist., 10 à 15 U. I. anti-sept.

Dans le tableau précédent, nous indiquons l'activité des sérums respectivement prélevés au bovin 39, le *quatrième* et le *dix-huitième* mois après le début des injections simultanées d'antigènes histolyticum et septicum (deuxième immunisation). Le premier de ces sérums titre, d'après la méthode internationale, 60 à 70 U. I. anti-hist., 50 U. I. anti-sept. D'après les dosages en présence de 2 toxines, ce sérum contient : a) 30 à 35 U. I. anti-hist. lorsqu'il est titré en présence de la quantité de toxine septicum qui sature 45 U. I. anti-sept. ; b) 10 unités anti-septicum seulement lorsqu'il est préalablement additionné de la quantité de toxine histolytique qui sature 60 unités anti-histolyticum.

Le sérum 39 prélevé dix-huit mois après le début des injections d'antigènes histolyticum et septicum titre : 1°) 80 à 90 U. I. anti-hist., 75 à 80 U. I. anti-sept. d'après la méthode internationale ; 2°) 40 à 50 U. I. anti-hist., en présence de la dose de toxine septicum qui sature 70 U. I. anti-septicum ; 3°) 60 à 70 U. I. anti-sept., en présence de la dose de toxine histolytique qui sature 70 U. I. anti-hist. Par conséquent, lorsque ce sérum est additionné d'une forte quantité de toxine septicum, il manifeste

encore une activité anti-*histolyticum* α importante. Lorsqu'il est d'abord additionné d'une forte dose de toxine histolytique, il perd peu de son pouvoir anti-septicum : il neutralise, en effet, dans ces conditions, presque autant de toxine septicum que lorsqu'il n'est pas mis en présence de toxine histolytique. Les propriétés antitoxiques du sérum 39 prélevé dix-huit mois après le début de la deuxième immunisation indiquée tendent donc à être additives.

DISCUSSION.

Le caractère additif des propriétés anti-léthales des sérums que nous avons examinés se révèle donc lorsque les animaux donneurs reçoivent depuis longtemps, au cours d'une deuxième immunisation, des injections mixtes d'anatoxine *histolyticum* et de toxine septicum (les antigènes sont toujours préparés en bouillon VI avec la souche Letivi de *Cl. histolyticum* et avec la souche Feuten de *Cl. septicum*).

Si de nombreux animaux recevaient dès le commencement de l'expérimentation des inoculations simultanées d'antigènes *histolyticum* et septicum, certains d'entre eux s'immuniseraient vraisemblablement très promptement et intensément. Il est possible que le sérum des animaux les plus réceptifs posséderait des propriétés anti-léthales additives dès l'apparition de la double immunité anti-*histolyticum* et anti-septicum que les injections auraient déclenchée. Nous savons, en effet, que les chevaux auxquels on injecte uniquement de l'anatoxine histolytique fournissent pendant les premiers mois de l'immunisation un sérum spécifique anti-*histolyticum*. Nous avons constaté, d'autre part, que si l'on prélève régulièrement du sang à des chevaux préparés uniquement contre les antigènes élaborés par *Cl. septicum* (souche Feuten), les sérums récoltés pendant les six à huit premières semaines de l'immunisation sont spécifiquement anti-septicum : ils ne neutralisent que la toxine septicum (ce n'est qu'ultérieurement que beaucoup de ces chevaux fournissent des sérums dont le titre anti-*histolyticum* α [1] atteint une valeur plus ou moins élevée). Rappelons aussi que notre méthode de titrage en présence de deux toxines (*histolyticum* et septicum) permet de vérifier que le mélange obtenu en ajoutant un sérum anti-*histolyticum* spécifique à un sérum anti-septicum spécifique possède des propriétés antitoxiques additives. Il est permis de penser qu'un animal normal qui recevrait dès le début de l'expérience des injections simultanées d'anatoxine histolytique et d'antigènes septicum élaborerait d'emblée des anticorps spécifiquement dirigés contre chacun des antigènes injectés et que les propriétés de ces anticorps dans son sérum seraient aussi nettement additives que celles d'un mélange expérimental de sérums spécifiques anti-*histolyticum* et anti-septicum.

RÉSUMÉ.

Des bovins ayant reçu, pendant quelques mois, des injections d'anatoxine *histolyticum*, puis, pendant dix-huit à vingt-quatre mois, des inoculations simultanées d'anatoxine *histolyticum* et d'antigènes *septicum*, procurent des sérums capables d'exercer une activité anti-*histolyticum* importante en présence d'une grande quantité de toxine *septicum*; certains de ces anti-sérums conservent, en présence d'une forte dose de toxine histolytique, une activité anti-*septicum* relativement élevée : leurs propriétés antitoxiques tendent à être additives.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY. *Ces Annales*, 1954, **86**, 38.
- [2] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER, M. GEOFFROY et G. READE. *Ces Annales*, 1953, **84**, 516.

ÉTUDES SUR LES *ESCHERICHIA COLI* ISOLÉS AU COURS DES GASTRO-ENTÉRITES INFANTILES

I. — PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES ET ANTIGÉNIQUES

par SIMONE LE MINOR, LÉON LE MINOR, PIERRE NICOLLE
et RENÉ BUTTIAUX (*).

(Institut Pasteur.)

I. — ORIGINE DES SOUCHES.

La majorité des souches que nous avons étudiées a été isolée en France (Paris et Lille). Mais il nous a paru intéressant d'étudier comparativement des souches provenant d'autres pays, en particulier d'Allemagne, d'Autriche, du Canada, du Danemark, de Grande-Bretagne et d'Italie. Ces souches avaient été adressées pour la détermination du type bactériophagique à P. Nicolle et L. Le Minor, par nos collègues cités ci-dessous que nous remercions :

Allemagne (Hambourg) : D^r Moser. Autriche (Vienne) : D^{rs} Krepler, Zischka et Roschka. Canada (Chicoutimi) : D^r Butas. Danemark (Copenhague) : D^{rs} Kauffmann et Orskov. Grande-Bretagne (Londres) : D^r Cathie ; (Aberdeen) : D^r Smith ; (Birmingham) : D^r Rogers. Italie (Palerme) : D^r d'Alessandro.

II. — TECHNIQUE D'ISOLEMENT.

Les souches provenant des hôpitaux de Paris ont été isolées suivant la technique que nous allons donner en détail.

Les selles sont ensemencées sur gélose de Drigalski, de Kristensen et sur milieu S. S. De plus, un milieu d'enrichissement de Müller-Kauffmann est ensemencé, et après dix-huit heures d'étuve à 37°, repiqué sur géloses de Kristensen et S. S. Par cette technique les *Salmonella*, les *Shigella* peuvent être isolées parallèlement aux *E. coli* qui sont recherchés sur le milieu de Drigalski ou sur gélose lactosée au bromo-crésol pourpre. Pour ces derniers, une agglutination directe sur lame des colonies lactose positives est pratiquée avec les sérums anti-111:B4,

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} octobre 1953.

55:B5 et 26:B6, dilués au 1/10. Si une agglutination totale et immédiate est obtenue, on repique quatre colonies suspectes, chacune dans un tube de bouillon. Une moitié de celui-ci est portée au bain-marie bouillant pendant deux heures et demie et servira à la recherche quantitative des différents antigènes O. L'autre moitié, utilisée vivante, sert à déterminer les antigènes K.

Le lendemain, nous procédons à un titrage quantitatif en tubes : sont considérées comme appartenant à l'un des trois groupes les souches qui répondent aux trois conditions suivantes : fermentent le lactose à l'isolement, sont agglutinées sur lames et en tubes (O et K), au titre du sérum.

Nous signalons simplement ici que ces souches ont été ensuite étudiées du point de vue de leur sensibilité aux bactériophages (lysotypie) par P. Nicolle.

MILIEUX UTILISÉS POUR L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES.

— Nous avons, pour toutes nos souches, recherché :

1° L'hydrolyse de l'urée et la production d'indole sur le milieu de Roland, Bourbon et Szturm [13]. Si le germe possède une uréase, le milieu devient alcalin et l'indicateur vire au rouge violacé. La recherche de l'indole était faite après vingt-quatre heures d'incubation, au moyen de la paradiméthylamino-benzaldéhyde (formule de Kovacs [13]).

2° Les réactions du rouge de méthyle et de Voges-Proskauer sur milieu de Clark et Lubs [5].

3° L'utilisation du citrate de sodium comme seule source carbonée sur milieu synthétique de Simmons [5].

4° La production d'hydrogène sulfuré sur gélose au sous-acétate de plomb additionnée d'hyposulfite de sodium.

5° La fermentation du *d*-tartrate de sodium sur le milieu liquide préconisé par Kauffmann [5].

6° Le pouvoir gélatinolytique sur gélatine nutritive.

7° La fermentation du glycérol en bouillon glycérol-fuchsine de Stern [5].

8° Le pouvoir fermentatif de nos souches sur divers osides ou alcools (xylose, arabinose, glucose, mannitol, dulcitol, lactose, maltose, saccharose, adonitol, sorbose, tréhalose, salicine, sorbitol, inositol) en eau peptonée, renfermant 0,5 p. 100 de ces substances et en présence de bleu de bromothymol comme indicateur de pH. Afin d'éviter des dégradations éventuelles par passage à l'autoclave, toutes ces solutions furent filtrées sur bougie Chamberland L₃ et réparties en tubes de Durham.

L'incubation se fit à 37° durant trente jours, et nous avons examiné et noté quotidiennement les virages éventuels (certaines souches de *E. coli* 111:B4 faisant fermenter tardivement le dulcitol, certaines souches de 55:B5, le maltose) et la production de gaz.

TECHNIQUE D'ANALYSE ANTIGÉNIQUE. — Rappelons brièvement les conceptions actuelles sur la constitution antigénique des coliformes :

C'est à Kauffmann [3], Knipschildt [7] et Vahlne que l'on doit la classification sérologique actuelle des coliformes.

1° *Antigènes O et H.* — Les *E. coli* en forme lisse, normale, possèdent un antigène O spécifique du groupe qui présente les mêmes caractéristiques que les antigènes O des Salmonelles : thermostable à 100°, alcoolostable, extractible par la méthode de Boivin et Mesrobian à l'acide trichloracétique.

Ils possèdent, s'ils sont mobiles, un antigène H thermolabile, résistant au formol. Mais, contrairement aux Salmonelles, les *E. coli* sont en général très peu mobiles à l'isolement et pour étudier leurs antigènes H, il est nécessaire d'exalter leur mobilité. Les antigènes H des coliformes sont toujours monophasiques.

2° *Antigène K.* — Les *E. coli* peuvent posséder un autre antigène, l'antigène K (Kapsel Antigene), lequel a été subdivisé en trois groupes :

a) *L'antigène L.* — C'est un antigène de surface pour lequel il est exceptionnel d'observer un gonflement en présence du sérum anti correspondant. Au cours des repiquages, les cultures L+ se dissocient en colonies L— translucides et L+ opaques. Cet antigène L est détruit par un chauffage de deux heures trente à 100°, par CIH N/1, vingt heures à 37°. Par contre, le formol à 5 p. 1 000 n'a aucune action.

C'est à cet antigène L qu'est due l'inagglutinabilité O de 80 p. 100 des souches. Elles sont toxiques pour la souris en injection intrapéritonéale, souvent hémolytiques pour les globules rouges de cheval et nécrosantes en injections intradermiques pour le lapin. La majorité des souches pathogènes pour l'homme possède un antigène L. Les souches possédant un antigène L ont rarement les antigènes O 8 et O 9.

b) *L'antigène A.* — Cet antigène est le seul qui, chez les *E. coli*, soit vraiment capsulaire. En présence du sérum anti-A correspondant, il se produit un gonflement de la capsule. La dissociation en colonies A+ et colonies A— est fréquente. Il existe des formes intermédiaires. Cet antigène est thermostable : le chauffage pendant deux heures et demie à 100° ne le détruit pas. Cependant son pouvoir antigène après ce traitement est souvent diminué. De même, après traitement par CIH N/1 pendant vingt heures à 37°, l'agglutinabilité A est conservée, bien que le pouvoir agglutinogène soit diminué. L'antigène A provoque l'inagglutinabilité O d'environ 20 p. 100 des souches. Moins toxiques pour la souris que les souches possédant l'antigène L, celles qui possèdent l'antigène A ne sont pas hémolytiques et sont rarement nécrosantes pour la peau du lapin. Elles sont moins pathogènes

pour l'homme que celles qui possèdent l'antigène L. En général, la présence de l'antigène A est liée à celle des antigènes O 8 et O 9.

c) *L'antigène B.* — Les antigènes du groupe B sont ceux qui nous intéressent particulièrement dans ce travail : les *E. coli* des gastro-entérites du nourrisson possèdent tous un antigène de surface de ce type.

De telles souches OB ne se dissocient jamais spontanément, ni après l'action des bactériophages, en formes OB et O. Il est donc impossible, à l'heure actuelle, d'obtenir un sérum anti-B pur en saturant un sérum OB par une souche O. L'augmentation, par entraînement, de la mobilité diminue la quantité d'antigène B, mais ne la supprime jamais totalement (R. E. Hilton et J. Taylor, *Nature*, 1951, **167**, 359). Les méthodes chimiques classiques ne semblent pas non plus avoir permis de séparer les deux antigènes O et B. Nous avons préparé un extrait trichloracétique par la méthode de Boivin à partir de deux souches de *E. coli*. Nous espérions que cet extrait ne contiendrait que l'antigène O. Malheureusement, il s'est montré capable de saturer aussi bien les agglutinines B que les agglutinines O.

Comme l'antigène L, l'antigène B paraît être un antigène de surface qui rend, généralement, chez la souche vivante, l'antigène O inagglutinable par l'anti-sérum. L'agglutinabilité de cet antigène B est supprimée par un chauffage de deux heures trente à 100°, de sorte qu'après ce traitement, l'antigène O devient agglutinable. Ainsi dans un sérum OB préparé par injection au lapin de germes vivants, la souche vivante sera agglutinée au 1/400 (B) et la souche chauffée au 1/12 800 (O).

Ce chauffage ne détruit pas le pouvoir de l'antigène B (rendu cependant inagglutinable par ce traitement) de saturer les agglutinines correspondantes : en additionnant un sérum OB d'une suspension de germes chauffés, les agglutinines O et les agglutinines B sont saturées.

Le formol, le traitement par CIH N/1 pendant vingt heures à 37° n'ont pas d'action sur cet antigène.

Nos sérums OB ont été préparés en injectant au lapin, par voie intraveineuse, des cultures sur gélose glucosée, vivantes, âgées de 18 heures.

Relations antigéniques avec d'autres Entérobactériacées. — En 1946, Varela et ses collaborateurs [14] ont signalé qu'un *E. coli* isolé de gastro-entérite infantile (souche Gomez) possédait l'antigène O XXXV de *Salmonella adelaide*. En 1952, Olarte et Varela ont rapporté que cette souche était un *E. coli* 111:B4.

Kauffmann [6], en 1952, a repris cette étude et a montré que les antigènes somatiques des *E. coli* 111:B4 étaient identiques à ceux des *Salmonella* du groupe O XXXV (*S. adelaide* et

S. monschau), que les types d'Arizona du groupe O 9 possédaient l'antigène B5 et que leur antigène O était voisin du O 55 des *E. coli*.

III. — IDENTIFICATION DE L'ANTIGÈNE H.

À l'isolement, la plupart des *E. coli* isolés de gastro-entérites sont très peu mobiles. La recherche de l'antigène H nécessite donc de nombreux passages sur gélose molle. C'est pourquoi peu d'auteurs se sont intéressés, malgré son intérêt, à cette recherche qui est beaucoup trop longue pour être pratiquée couramment. Kauffmann et Dupont [4], en 1950, ont pour la première fois donné une classification sérologique des antigènes H pour les *E. coli* 111:B4 et 55:B5 isolés au cours de gastro-entérites. Puis Orskov [44], en 1951, au cours d'une étude sur les *E. coli* 26:B6 décrit l'antigène H11 pour ce groupe.

Nous avons recherché ces antigènes H sur des souches rendues très mobiles par repiquages successifs en tubes de Craigie que nous décrivons ci-dessous. C'est, en effet, cette technique qui nous a paru la plus simple et la plus rapide, préférable au point de vue manipulation, à la technique des tubes en U. Nous utilisons des tubes de 17, dans lesquels nous introduisons un tube de pipette (7 mm de diamètre et 10 cm de long) ouvert aux deux extrémités ; puis, nous coulons du bouillon gélosé à 0,5 p. 100 à l'intérieur et à l'extérieur du petit tube en veillant à ce que l'orifice supérieur du petit tube dépasse de 2 cm environ le niveau supérieur de la gélose.

Nous introduisons l'inoculum à l'intérieur du petit tube : les germes les plus mobiles descendent le long de celui-ci, puis contournent son extrémité inférieure et remontent à l'extérieur jusqu'à la surface. Nous reprenons les germes parvenus à la surface extérieure et les réensemencons sur un nouveau tube de Craigie. Les souches peu mobiles demandent plusieurs jours avant de remonter à la surface. De nombreux repiquages sont nécessaires (plusieurs mois pour certains *E. coli* 111:B4:2) pour qu'elles parviennent à la surface en quarante-huit ou même vingt-quatre heures.

Ce sont ces germes rendus très mobiles par passages successifs et envahissant le milieu gélose molle en quarante-huit heures ou vingt-quatre heures que nous ensemencons en bouillon. Nous laissons ce bouillon huit à dix heures à l'étuve et nous l'additionnons de 0,5 p. 100 de formol, comme pour la préparation des suspensions H des Salmonelles. Cette suspension formolée placée vingt-quatre heures à l'étuve, puis conservée en glacière, nous sert à déterminer l'antigène H. Nous titrons ces suspensions vis-à-vis des différents sérums anti-H correspondant aux antigènes identifiés jusqu'à ce jour pour les *E. coli* isolés de gastro-entérites.

Dans les cas où l'antigène H ne correspond pas à ces sérums, nous utilisons les autres sérums anti-H de *E. coli* numérotés de 1 à 22, en notre possession.

PRÉPARATION DES SÉRUMS ANTI-H. — Nous avons préparé les sérums anti-H par inoculation au lapin d'une culture formolée, très mobile, de différentes souches d'*E. coli* provenant de la collection du Centre International de Copenhague (Kauffmann).

Le sérum 2 a été préparé avec la souche Bi 7455/41.

Le sérum 6 a été préparé avec la souche A 20 a.

Le sérum 7 a été préparé avec la souche U 5/41.

Le sérum 11 a été préparé avec la souche Su 4321/41.

Le sérum 12 a été préparé avec la souche Bi 316/42.

Ces souches possèdent le même antigène H que les souches d'*E. coli* isolées de gastro-entérites, mais n'appartiennent pas au même groupe O.

Les lapins reçoivent trois injections intraveineuses à quatre jours d'intervalle d'une culture de huit heures en bouillon formolée contenant 1, 2 et 4 milliards de germes.

Sept jours après la dernière injection, nous faisons une prise d'essai au lapin et nous titrons le sérum vis-à-vis de la souche ayant servi à le préparer. Si le titre est satisfaisant (1/6 400 au minimum), nous saignons le lapin dix jours après la dernière injection.

Un titrage de contrôle est effectué et le sérum réparti en ampoules est conservé à la glacière.

TECHNIQUE. — Les suspensions formolées des souches rendues très mobiles sont titrées d'abord dans un but d'orientation. Nous titrons ces différentes suspensions vis-à-vis de tous les sérums anti-H correspondants aux *E. coli* isolés de gastro-entérites et sans tenir compte de leur groupe sérologique 111:B4, 55:B5 ou 26:B6, déjà déterminé par agglutination sur lames. Ceci nous permet un contrôle et évite les erreurs de coagglutinations possibles avec des souches atypiques.

Dans cette épreuve d'orientation, nous titrons en tubes les souches vis-à-vis des sérums anti-H 2, 6, 7, 11, 12.

2 et 12 correspondant aux 111:B4,

6, 7 et 2 correspondant aux 55:B5,

et 11 correspondant aux 26:B6.

Les dilutions finales des sérums sont pour ce premier examen de 1/100 et 1/200.

Nous plaçons les portoirs pendant deux heures à l'étuve à 37°, puis nous faisons la lecture. Dans les tubes où l'agglutination est apparue, elle se présente sous forme de gros flocons lâches, se dissociant facilement par agitation des tubes.

Pour les souches qui nous ont donné un résultat positif dans un des sérums ci-dessus, nous poursuivons le titrage (jusqu'au titre final du sérum) en moyenne 1/8 400 à 1/12 800.

Les premiers antigènes H, identifiés chez les *E. coli* isolés de gastro-entérites, l'ont été par Kauffmann et Dupont [4] en 1950, qui ont décrit pour les 111:B4 les antigènes 2 et 12, pour les 55:B5 les antigènes 6 et ? (indéterminé).

Récemment, Laurell [9], à Stockholm, a isolé et décrit deux souches du groupe 55:B5 possédant l'antigène 11:2 et, dernièrement, Krepler et Zischka [8] ont décrit un nouveau type de 55:B5 possédant l'antigène H:7.

Pour le 26:B6, le seul antigène H identifié jusqu'à maintenant l'a été par Orskov [41] : c'est l'antigène 11.

Nous n'avons jamais observé de coagglutination importante, sauf pour les souches qui n'appartenaient pas aux groupes 111:B4, 55:B5 ou 26:B6, et qui, cependant, avaient été, par erreur, classées comme telles. Il existe, d'autre part, une légère coagglutination entre H11 et H21. Nous en reparleront ultérieurement.

IV. — COMPORTEMENT DES « E. COLI » SUR MILIEU GÉLOSÉ A L'ACIDE β -PHÉNYL-PROPIONIQUE.

Nous avons étudié pour toutes nos souches la réaction décrite en 1952 par d'Alessandro et Comes [1] à Palerme (réaction à l'acide β -phényl-propionique).

Ces auteurs avaient remarqué que, sur certaines géloses, les Entérobactériacées (*Salmonella*, *Shigella* et *Escherichia*) se comportaient de façon différente, certaines provoquant autour de leurs colonies l'apparition d'une couleur brunâtre. Après une étude chimique des différentes peptones entrant dans la composition des milieux, ils ont observé que ce fait était lié à la présence dans certaines d'entre elles, de l'acide β -phényl-propionique (connu également sous le nom d'acide hydrocinnamique).

Pour effectuer cette réaction, il suffit de préparer un bouillon gélosé ordinaire que l'on additionne d'acide β -phényl-propionique à la concentration terminale de 1 p. 5 000, d'autoclaver trente minutes à 105°, d'ajuster à pH 7,2 et de couler en boîtes. L'ensemencement se fait en surface, soit à partir d'une culture en bouillon, soit à partir d'une culture sur gélose, et en étalant l'inoculum sur une plage d'environ 1 cm de diamètre. Les boîtes sont laissées vingt-quatre heures à l'étuve à 37°. La lecture se fait en pratique au bout de ce temps. La réaction s'intensifie si on laisse les boîtes à la température ordinaire et au laboratoire pour atteindre son maximum en quatre à cinq jours. Une réaction positive se manifeste par une couleur brunâtre à la surface de la culture. Cette couleur diffuse dans le milieu.

D'Alessandro et Comes, après étude de quelques souches d'*E. coli* 111:B4 et 55:B5, avaient pu établir une classification correspondant, pour les 111:B4 du moins, au groupe sérologique de ces souches. C'est ainsi que les *E. coli* 111:B4 immobiles et les *E. coli* 111:B4:2 étudiés par eux donnaient tous une réaction acide phényl propionique positive alors que les *E. coli* 111:B4:12 donnaient une réaction négative. Pour les *E. coli* 55:B5 les résultats obtenus portant seulement sur l'étude de quelques souches sont variables et ne permettent pas une classification comme pour les *E. coli* 111:B4.

Ces auteurs n'ont pas étudié cette réaction pour les *E. coli* 26:B6.

V. — RÉSULTATS.

Après avoir énuméré les propriétés générales communes à tous les *E. coli* isolés au cours des gastro-entérites infantiles, nous rapporterons les différents types biochimiques et sérologiques que nous avons trouvés pour chaque groupe (111:B4, 55:B5, 26:B6) en classant nos souches par origine. Nous signalerons les types biochimiques ou sérologiques que nous avons étudiés et nous terminerons en mentionnant les souches atypiques que nous avons pu observer lors de nos examens.

Nous donnerons plus loin un tableau indiquant les principaux caractères biochimiques des souches que nous avons étudiées. Dans ce tableau, toutes les souches se comportant d'une façon analogue seront citées en groupe et nous n'indiquerons que le total des souches, en faisant une moyenne pour les différentes variations des fermentations dans le temps (tableaux I, II, III).

Nous désignerons par le signe +1 une réaction positive après vingt-quatre heures, par les signes +2 et +3 une réaction n'apparaissant que le deuxième ou le troisième jour après l'ensemencement, par le signe — une réaction négative (la date limite de notre examen étant : trente jours d'étuve), par le signe x une réaction variable et par G la présence de gaz.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES COMMUNS A TOUS LES « *E. COLI* » ISOLÉS DE GASTRO-ENTÉRITES. — Les *E. coli* isolés de gastro-entérites n'hydrolysent pas l'urée (une seule exception). Sur le milieu choisi par nous ils ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'hydrogène sulfuré. Ils donnent une réaction de Voges-Proskauer négative et une réaction au rouge de méthyl positive.

En bouillon glycérol-fuchsine de Stern, ils donnent une réaction négative.

Le *d*-tartrate n'est pas fermenté, à de très rares exceptions près.

Ils sont incapables d'utiliser comme seule source carbonée le

citrate de Na sur milieu synthétique de Simmons (une exception : la souche de *E. freundii*). La grande majorité des souches produit de l'indole ; Kauffmann [4], dans l'établissement de ses premiers types fermentatifs, sur un total de 34 souches, n'en signale que 7 ne produisant pas d'indole ; sur un total de 350 souches nous n'en avons trouvé que 3. Or ces 3 souches nous avaient été transmises par Kauffmann.

Toutes les souches font fermenter rapidement (en vingt-quatre heures) le xylose, l'arabinose, le glucose avec production de gaz, le mannitol, le lactose et le tréhalose.

La fermentation des autres sucres varie suivant les groupes 111, 55 et 26 et, à l'intérieur de ces groupes, suivant les types sérologiques H. Nous avons étudié ces souches au fur et à mesure de leur isolement ou de leur réception, nous les classerons dans notre travail par origine.

I. — Souches isolées à Paris.

1^o GROUPE 111:B4. — Sur 132 souches identifiées comme *E. coli* 111:B4 (par agglutination sur lames et titrage quantitatif des antigènes O et K), nous avons retrouvé, après une étude biochimique et sérologique complète, 129 fois les deux types sérologiques décrits par Kauffmann et Dupont [4] en 1950 :

114 souches ont été identifiées comme 111:B4:2.

15 souches ont été identifiées comme 111:B4:12.

Sur ces 132 souches, 3 se comportaient de façon anormale.

111:B4:2. — Les 114 souches étudiées étaient entièrement homogènes du point de vue de leurs propriétés biochimiques.

En plus des caractères généraux communs à tous les *E. coli* isolés de gastro-entérites que nous avons énumérés plus haut, elles faisaient toutes fermenter rapidement le xylose, l'arabinose, le glucose avec production de gaz, le mannitol, le lactose, le maltose et le tréhalose.

La fermentation du dulcitol, du saccharose, du sorbitol et de la salicine présentait quelques variations dans le temps. Mais toutes ces substances étaient fermentées en sept jours au maximum. Par contre, l'adonitol, le sorbose et l'inositol n'étaient pas fermentés, même après trente jours d'étuve.

Toutes ces souches produisaient de l'indole.

Pour ces 114 *E. coli* 111:B4 l'antigène H₂ a pu être déterminé et titré, sauf pour 3 souches qui, bien que mobiles, n'envahissaient pas la gélose assez rapidement pour permettre un titrage des antigènes H.

Les titrages quantitatifs nous ont donné des résultats identiques pour toutes les souches : elles étaient agglutinées au titre du

sérum : 1/6 400 et 1/12 800 (déterminé vis-à-vis des souches type).

Il est à noter, cependant, que toutes étaient, à l'isolement, très peu mobiles, et qu'elles ont nécessité de nombreux repiquages sur gélose molle. Nous avons dû poursuivre ces repiquages parfois pendant plusieurs mois avant de pouvoir déterminer l'antigène H.

111: B4: 12. — Les 12 souches d'*E. coli* 111: B4: 12 isolées à Paris avaient les mêmes propriétés générales que les précédentes, mais elles ne faisaient fermenter ni le saccharose, ni l'adonitol, ni le sorbose, ni l'inositol. Elles appartenaient toutes au type déjà décrit par Kauffmann et Dupont [4]. Toutes produisaient de l'indole.

Souches atypiques. — 1° Quatre souches se distinguaient par le fait que, même au bout de trente jours, elles ne faisaient pas fermenter le dulcitol (451, 442, 526 et 1233).

Toutes ces souches étaient rendues mobiles très rapidement (5 ou 6 passages sur gélose molle en tubes de Craigie suffisaient pour qu'elles envahissent le milieu en vingt-quatre ou quarante-huit heures).

2° Deux autres souches avaient été identifiées comme *E. coli* 111: B4 par agglutination sur lame, et l'étude des propriétés biochimiques nous les avait fait classer dans le groupe 111: B4: 12 : elles ne faisaient pas fermenter, en effet, le saccharose, l'adonitol, le sorbose et l'inositol, et même au bout de trente jours (contrairement aux précédentes) elles étaient sans action sur la salicine. Mais, malgré plusieurs repiquages sur gélose molle, ces souches se sont montrées absolument immobiles (448 et 441). Dans le but de savoir s'il nous était permis de classer ces souches dans le groupe 111: B4 (dont elles possédaient les caractères biochimiques) et de les considérer comme des variantes immobiles du type 111: B4: 12, nous avons recherché, en préparant un sérum, si elles possédaient les antigènes du groupe.

Ce sérum a été préparé par inoculation au lapin d'un bouillon formolé de la souche 448. Nous avons fait 4 injections intraveineuses à quatre jours d'intervalle, le lapin a été saigné dix jours après la dernière injection.

Ce sérum agglutinait les souches 448, 441, Stocke W (souche type du Centre International de Copenhague) vivantes (B) au titre de 1/400 et chauffées (O) au titre de 1/1 600.

Technique de saturation. — Nous avons ensuite saturé ce sérum (10 cm³ au 1/20) par la culture de 3 boîtes de Roux de la souche type Stocke W. Nous avons laissé cette suspension deux heures à l'étuve, puis vingt heures à + 4°. Après centrifugation, nous avons titré à nouveau ce sérum saturé vis-à-vis des souches Stocke W, 448 et 441 (vivantes et chauffées). Il ne restait plus d'agglutinines.

Pour éliminer l'éventualité de l'existence d'un autre antigène H,

nous avons préparé des bouillons formolés de ces deux souches et nous les avons titrés vis-à-vis de tous les sérums anti-H de *E. coli* en notre possession (1 à 22). Nous n'avons obtenu aucune agglutination. Inversement, nous avons titré le sérum 448 vis-à-vis d'une suspension H₁₂, nous demandant si, bien que ces souches soient immobiles, le sérum homologue ne possédait pas d'agglutinines H. Le résultat de ce titrage fut également négatif.

Nous avons donc été amenés à conclure que ces souches, bien que possédant les propriétés biochimiques et donnant la réaction à l'acide β -phényl-propionique des 111:B4:12, étaient des variantes immobiles de ce groupe.

Nous avons retrouvé deux fois ce même type parmi les souches provenant de Lille.

3° Une souche isolée à Paris (122) avait été, lors de son isolement, classée dans le groupe *E. coli* 111:B4. Une étude plus approfondie de ses propriétés biochimiques et sérologiques nous l'a fait considérer comme une souche atypique, en effet :

Elle ne produisait pas d'indole, elle utilisait le citrate de Na et produisait de l'hydrogène sulfuré.

Les seuls sucres qu'elle ne faisait pas fermenter étaient le dulcitol, l'adonitol et l'inositol.

Elle était très mobile, mais elle possédait un antigène H différent des antigènes H numérotés de 1 à 22.

Pour confirmer que cette souche qui possédait tous ces caractères anormaux appartenait au groupe 111:B4, nous avons saturé un sérum 111:B4, Stocke W (10 cm³ au 1/10) par la récolte de deux boîtes de Roux de notre souche. Alors qu'avant saturation elle était agglutinée aux titres de 1/3 200 (O) et de 1/400 (K), après saturation il ne restait plus aucune agglutinine.

Cette souche possédait donc bien les antigènes somatiques et d'enveloppe du groupe 111:B4, mais son antigène H encore indéterminé n'était pas identifiable aux antigènes H numérotés de 1 à 22 (111:B4:?) et elle avait les propriétés biochimiques de *E. freundii*. Elle se rapprochait d'une souche décrite par Orskov, Schmid et Velaudapillai [12].

2° GROUPE 55: B5. — Trois types sérologiques et biochimiques ont été décrits jusqu'à maintenant : 55: B5: 6, 55: B5: 2 et 55: B5: 7.

A Paris, sur 19 *E. coli* 55: B5, nous avons retrouvé dix-huit fois le type 55: B5: 6 et une seule fois le type 55: B5: 7.

Toutes les souches possédaient les propriétés générales déjà décrites.

Toutes produisaient de l'indole.

La fermentation du maltose était variable (+ pour certaines souches, — pour d'autres). La fermentation du dulcitol, du

saccharose et du sorbose était rapide, seuls l'adonitol, le sorbitol, la salicine et l'inositol n'étaient pas fermentés.

La souche 55:B5:7 différait des 55:B5:6 par ses propriétés biochimiques particulières : elle attaquait rapidement le maltose, le dulcitol, le saccharose, le sorbose et le sorbitol ; seuls, l'adonitol, la salicine et l'inositol n'étaient pas fermentés.

Comme les 111:B4:12, et contrairement aux 111:B4:2 isolés à Paris, toutes ces souches étaient très mobiles à l'isolement et nécessitaient peu de repiquages pour la détermination de l'antigène H.

Nouveau type : 55:B5:11. — Cette souche (602 b), isolée à Paris, possédait des propriétés biochimiques et un antigène H non encore décrits pour le groupe 55:B5.

Elle n'attaquait pas le dulcitol, le saccharose, le sorbose, la salicine et l'inositol.

Elle possédait l'antigène H₁₁, qui avait été décrit jusqu'à maintenant uniquement dans le groupe 26:B6.

Comme toujours, pour pouvoir affirmer que cette souche possédait bien la formule 55:B5:11, nous avons fait des saturations, d'une part du sérum anti-55:B5, d'autre part du sérum anti-H₁₁.

Cette souche était agglutinée avant saturation par les sérums 55:B5 et H₁₁ aux titres suivants : 1/12 800 (O), 1/400 (K), 1/25 600 (H₁₁).

Nous avons saturé le sérum 55:B5 (1064) par cette souche (602 b). Après saturation, ce sérum n'agglutinait plus ni la souche 602 b, ni la souche 1064.

Nous avons également saturé le sérum H₁₁ par notre souche, la saturation a également été complète. Nous pouvions donc affirmer que cette souche possédait bien la formule 55:B5:11.

3° GROUPE 26:B6. — Les 13 souches d'*E. coli* 26:B6 isolées à Paris appartenaient toutes aux types déjà décrits par Orskov [41].

Six souches appartenaient au type 2, ne faisaient pas fermenter l'adonitol, le dulcitol et l'inositol, la fermentation de la salicine était variable. Toutes les souches produisaient de l'indole et faisaient fermenter rapidement le xylose, l'arabinose, le glucose, le mannitol, le lactose, le saccharose, le sorbose, le tréhalose et le sorbitol. Toutes étaient mobiles et possédaient l'antigène H₁₁.

Cinq souches étaient immobiles, appartenaient au type 1 d'Orskov et faisaient fermenter rapidement le dulcitol, mais non l'adonitol ni l'inositol.

Deux souches présentaient les propriétés biochimiques du type 3 (le dulcitol, l'adonitol, l'inositol n'étaient pas fermentés). Elles étaient immobiles et nous n'avons pas pu déterminer l'antigène H.

II. — Souches provenant du Nord de la France.

1^o GROUPE 111:B4. — 31 souches d'*E. coli* 111:B4 ont été étudiées. Sur ces 31 souches, 29 ont été identifiées comme des *E. coli* 111:B4:2 typiques. La seule remarque que nous ferons, c'est qu'en général, elles étaient beaucoup plus mobiles que les souches isolées dans les hôpitaux parisiens et en différaient par leur type bactériophagique et leur sensibilité aux antibiotiques.

Souches atypiques. — 2 souches (211 et 143) présentaient les mêmes caractères que 2 souches isolées à Paris (448 et 441).

Elles ne faisaient pas fermenter, non plus que ces deux dernières, le saccharose, l'adonitol, le sorbose, la salicine et l'inositol et elles étaient immobiles.

Les saturations des sérums préparés avec ces souches nous ont donné les mêmes résultats que ceux précédemment rapportés pour les souches parisiennes.

2^o GROUPE 55:B5. — Sur 14 souches étudiées, 10 présentaient les caractères biochimiques et sérologiques des *E. coli* 55:B5:6 décrits par Kauffmann et Dupont (100).

Une souche appartenait au type 55:B5:7.

Types anormaux. — 3 souches se comportaient, au point de vue biochimique, d'une façon anormale (246, 242, 153).

Pour l'une d'entre elles (153), nous avons pu identifier l'antigène H. Cette souche était agglutinée, en effet, au titre de 1/6 400, par le sérum anti-H₂. Elle différait du point de vue biochimique de la souche 55:B5:2, type envoyé par Kauffmann : contrairement à celle-ci, elle faisait fermenter rapidement la salicine.

La souche numérotée par nous 242 possédait les propriétés biochimiques du 55:B5:2 (Kauffmann) et était très mobile, mais elle n'était agglutinée par aucun des sérums anti-H que nous utilisons pour nos titrages courants, à savoir : les sérums anti-2, 6, 7, 11, 12.

Afin de pouvoir compléter l'identification de cette souche, nous l'avons titrée vis-à-vis de tous les sérums anti-H en notre possession (1 à 22). Bien que très mobile, notre souche n'était agglutinée par aucun de ces sérums. Cette souche possède donc un antigène H différent des antigènes H numérotés de 1 à 22.

La souche 246 possédait l'antigène H₁₂ et les propriétés biochimiques du 111:B4:12 typique. Nous reparlerons plus loin de cette souche.

3^o GROUPE 26:B6. — Des 4 souches d'*E. coli* 26:B6 que nous avons étudiées provenant de la région de Lille :

1 était mobile ; elle appartenait au type biochimique 2 d'Orskov et possédait l'antigène H₁₁.

3 étaient immobiles et appartenait au type biochimique 1 d'Orskov.

III. — Souches d'Autriche (Vienne).

1° GROUPE 111:B4. — 111:B4:2. — 32 souches ont été identifiées comme 111:B4:2, elles appartenait au type décrit par Kauffmann et Dupont [4].

Comme les souches isolées à Paris et contrairement à celles de Lille, elles étaient très peu mobiles. Et nous avons été obligés, pour déterminer l'antigène H, de repiquer ces souches pendant plusieurs mois.

111:B4:12. — 9 souches appartenait au type 111:B4:12.

5 possédaient les caractères biochimiques de ce type (le saccharose, l'adonitol, le sorbose, l'inositol n'étaient pas fermentés) et 4 étaient sans action sur le dulcitol, le saccharose, l'adonitol, le sorbose et l'inositol.

2° GROUPE 55:B5. — Un *E. coli* 55:B5:6 typique.

21 *E. coli* 55:B5:7 typiques également.

IV. — Souches de Copenhague.

1° GROUPE 111:B4. — 111:B4:2. — 8 souches typiques, très mobiles, dont 3 ne produisaient pas d'indol.

2° GROUPE 55:B5. — 11 souches dont 5 ont été déterminées comme 55:B5:6.

2 ont été déterminées comme 55:B5:2.

3 étaient immobiles : 2 possédaient les caractères biochimiques du groupe 55:B5 (maltose variable, adonitol, sorbitol, salicine, inositol non attaqués), la troisième souche possédait des caractères biochimiques particuliers (seuls l'adonitol et l'inositol n'étaient pas fermentés).

1 était un 55:B5:7.

3° GROUPE 26:B6. — 13 souches ont été identifiées, dont 5 appartenait au type biochimique 2 d'Orskov [41] et étaient mobiles (H₁₁). 7 autres étaient immobiles et appartenait au type 1 d'Orskov.

Souche atypique. — Une souche particulière, le n° 590, possédait une uréase. Nous avons pensé au début à une contamination, mais après isolement de cette souche en vue d'étudier l'hydrolyse

de l'urée, 10 colonies sur 10 possédaient cette propriété et avaient les mêmes propriétés biochimiques que les 26:B6:11. Il s'agissait donc bien d'un 26:B6:11, capable d'hydrolyser l'urée.

V. — Souches d'Italie (Palerme).

Parmi les souches du groupe 111:B4 reçues de Palerme, 11 souches possédaient des propriétés biochimiques particulières (seuls l'adonitol, la salicine et l'inositol n'étaient pas fermentés) et 10 d'entre elles possédaient un antigène H non encore décrit pour les 111:B4, l'antigène H₂₁. Une seule était immobile.

Ces souches nous paraissant anormales, nous avons fait des saturations, d'une part des agglutinines O et K, d'autre part des agglutinines H.

Saturation des agglutinines H : Nous avons saturé le sérum anti-H₂₁ (10 cm³ du sérum dilué à 1/20) par notre souche (récolte de 4 boîtes de Roux). Après séjour de deux heures à l'étuve et centrifugation, nous avons titré à nouveau ce sérum saturé : il ne possédait plus d'agglutinines H qu'au titre de 1/1 600, alors qu'avant saturation il agglutinait nos souches au 1/25 600.

Saturation des agglutinines O et K : Nous avons de la même façon saturé un sérum 111:B4, préparé avec la souche type Stocke W (10 cm³ au 1/20) par la culture de 3 boîtes de Roux de chacune de ces souches. Après séjour de deux heures à l'étuve, puis vingt heures à +4°, nous avons centrifugé et titré à nouveau le sérum ainsi saturé. Alors qu'avant saturation, le sérum agglutinait au titre de 1/3 200 les suspensions vivantes et chauffées, après saturation il n'y avait plus aucune agglutinine.

Les souches appartenaient bien au groupe 111:B4 et constituaient un nouveau type d'*E. coli* : 111:B4:21.

VI. — Souches du Canada (Chicoutimi) [47].

5 souches étudiées appartenaient au type 55:B5:6 et avaient les caractères biochimiques typiques.

1 souche appartenait au groupe 111:B4:12, mais ne faisait pas fermenter le dulcitol, le saccharose, l'adonitol, le sorbose et l'inositol.

VII. — Souches de Grande-Bretagne (Londres).

11 souches nous avaient été transmises comme appartenant au groupe 55:B5.

Après une étude biochimique et sérologique complète de ces souches, 1 seule nous a donné les caractères des 55:B5:6.

Souches atypiques. — Les 10 autres souches se comportaient de façon identique au point de vue biochimique (le dulcitol, l'adonitol, le sorbose et l'inositol, seuls, n'étaient pas fermentés) et elles possédaient cependant l'antigène H_2 . Le titrage quantitatif nous a donné des résultats identiques pour toutes ces souches : elles étaient agglutinées par le sérum au titre de 1/3 200 à 1/6 400.

Ces 10 souches étaient agglutinées par le sérum 55:B5 (souche 1064) au titre de 1/1 600 (souche vivante) et 1/19 200 (souche chauffée). Elles étaient capables de le saturer complètement (10 cm³ du sérum 55 au 1/20 par la récolte de 3 boîtes de Roux chauffées). Ceci confirmait donc bien qu'elles appartenaient au groupe 55:B5, et qu'elles constituaient un type biochimique nouveau d'*E. coli* 55:B5:2, vraisemblablement le même que celui signalé par Wright et Villanueva [16].

VIII. — Souches de Grande-Bretagne (Birmingham).

8 souches ont été examinées, elles appartenaient au groupe 55:B5.

4 possédaient l'antigène H_6 et avaient des propriétés biochimiques typiques.

Souches atypiques. — 4 possédaient l'antigène H_2 et différaient du type biochimique déjà décrit. Elles fermentaient en effet rapidement le saccharose et la salicine (contrairement aux 55:B5:2 isolés jusqu'à maintenant). Elles ne fermentaient pas le dulcitol, l'adonitol, le sorbose et l'inositol.

Toutes ces souches 55:B5:2 de Grande-Bretagne (Londres et Birmingham) de mêmes caractères biochimiques et sérologiques appartenaient à un type bactériophagique différent des types trouvés pour les souches 55:B5 précédemment isolées. Elles s'en distinguaient également par leur sensibilité plus faible aux antibiotiques.

IX. — Souches de Grande-Bretagne (Aberdeen).

Deux souches ont été étudiées :

Un *E. coli* 111:B4:12 atypique ne fermentant pas le dulcitol, le saccharose, l'adonitol, le sorbose et l'inositol.

Un *E. coli* 55:B5 dont les propriétés biochimiques étaient les suivantes : il ne fermentait pas le dulcitol, l'adonitol, l'inositol et possédait un antigène H non encore décrit pour les *E. coli* : H_{21} .

Pour affirmer que cette souche appartenait au groupe 55:B5,

nous avons saturé un sérum type (1064) par notre souche. La saturation a été complète.

Le titrage quantitatif des antigènes II nous a donné un titre de 1/12 800 vis-à-vis du sérum anti-II₂₁ (souche U 11a/44) et de 1/800 vis-à-vis du sérum anti-II₁₁. Pour pouvoir déterminer avec certitude l'antigène H de ce nouveau type, nous avons saturé, d'une part, le sérum anti-II₂₁ et, d'autre part, le sérum anti-II₁₁ par cette souche (644). Seul le sérum anti-H₂₁ fut saturé. L'agglutination dans le sérum 11 n'était donc qu'une coagglutination et notre souche possédait l'antigène H₂₁.

Remarque : Nous avons observé, pour la souche 602 b (Paris) identifiée comme 55:B5:11, une coagglutination analogue dans le sérum anti-II₂₁. Cette dernière souche était agglutinée au titre de 1/25 600 par le sérum anti-II₁₁ et au titre de 1/800 par le sérum anti-H₂₁. Mais elle ne saturait que le sérum anti-II₁₁.

X. — Souches d'Allemagne (Hambourg).

5 souches appartenait au type 111:B4:12.

2 possédaient les caractères biochimiques typiques (le saccharose, l'adonitol, le sorbose, l'inositol n'étaient pas fermentés).

3 ne faisaient pas fermenter le dulcitol, le saccharose, l'adonitol, le sorbose et l'inositol.

L'antigène H₁₂ a pu être facilement déterminé pour toutes.

XI. — Souches anormales.

Nous pensons qu'il est intéressant de terminer notre étude biochimique et sérologique par la description de trois souches pour lesquelles une erreur de diagnostic a été commise lors de l'identification sérologique rapide. Deux de ces souches ont été isolées à Paris (70, 95), la troisième à Lille (246).

Les trois souches, après agglutination sur lames et titrages quantitatifs des antigènes O et K, avaient été identifiées comme *E. coli* 55:B5. En effet, elles étaient agglutinées sur lame par le sérum anti-55:B5. Les agglutinats étaient cependant plus fins que ceux observés habituellement et les titrages quantitatifs de ces souches nous avaient donné des titres plus faibles que la majorité des *E. coli* 55:B5. Toutes les trois possédaient des propriétés biochimiques analogues, comparables à celles du type 111:B4:12 (seuls le saccharose, l'adonitol, le sorbose et l'inositol n'étaient pas fermentés), de plus elles étaient agglutinées par le sérum anti-H₁₂ au titre de 1/6 400, alors que cet antigène n'a jusqu'à présent jamais été signalé dans le

groupe 55: B5. Ces souches possédaient donc des propriétés biochimiques et sérologiques anormales pour des 55: B5. C'est pourquoi nous avons préparé un sérum, suivant la technique précédemment décrite.

Tandis qu'à l'isolement ces souches étaient agglutinées par le sérum 55: B5, au titre K de 1/100 et O de 1/800, le sérum préparé avec l'une d'elles plusieurs mois après l'isolement n'agglutinait plus les suspensions, chauffées et vivantes, des souches types Stocke W (111: B4), 1064 (55: B5), alors qu'il agglutinait encore les suspensions chauffées de ces trois souches en étude au titre de 1/1 600 et leurs suspensions vivantes à 1/800.

Nous avons inversement saturé un sérum 55: B5 par notre souche 246. Alors que le sérum 55 ainsi saturé n'agglutinait plus la souche 246, le titre vis-à-vis de la souche 55: B5 (1064) vivante et chauffée avait à peine baissé.

Ces trois souches ne saturant pas le sérum 55: B5 ne pouvaient donc pas être identifiées comme des *E. coli* de ce groupe, ainsi que nous l'avait fait présumer un diagnostic sérologique rapide.

Nous devons signaler que les deux souches parisiennes ont été isolées à la même date chez deux enfants atteints de gastro-entérite, hospitalisés dans le même service.

VI. — COMPORTEMENT DES « *E. COLI* » SUR MILIEU GÉLOSÉ A L'ACIDE β -PHÉNYL-PROPIONIQUE.

Nous avons examiné toutes nos souches (1 248) sur le milieu gélosé à l'acide β -phényl propionique. Cette étude nous a permis d'établir une classification intéressante qui confirme et complète les résultats obtenus sur un petit nombre de souches par d'Alessandro et Comes [4]. La parfaite correspondance entre les résultats des recherches biochimiques, sérologiques et bactériophagiques sur les 350 souches étudiées de façon complète nous autorise à généraliser les notions ainsi acquises.

Groupe 111: B4. — 846 souches ont été étudiées.

Tous les *E. coli* 111: B4:2, quelle que soit leur origine, donnent une réaction acide β -phényl-propionique positive (PP+).

Tous les 111: B4:12 donnent une réaction à l'acide β -phényl-propionique négative (PP—), de même que les 111: B4:21 transmis par d'Alessandro.

Les 5 souches qui possédaient les mêmes propriétés biochimiques que les 111: B4:12, mais qui étaient immobiles, ont donné une réaction à l'acide β -phényl-propionique négative (PP—) comme les 111: B4:12.

Groupe 55: B5. — 305 souches ont été étudiées.

Les *E. coli* 55: B5, quels que soient leur antigène H et leur origine, donnent une réaction à l'acide β phényl-propionique

négative (PP—), sauf les 55:B5:2 provenant de Grande-Bretagne : ces dernières souches avaient des propriétés biochimiques anormales et étaient les seules 55:B5 à donner une réaction à l'acide β -phényl-propionique positive (PP+).

Groupe 26:B6. — 97 souches ont été étudiées.

Tous les *E. coli* 26:B6 donnent une réaction à l'acide β -phényl-propionique négative (PP—). Il n'y a aucune différence entre les souches mobiles et immobiles.

VII. — CONCLUSION.

Nous rassemblons dans un tableau, pour chacun des trois groupes d'*E. coli*, les résultats globaux que nous a donnés l'étude antigénique (O, K, H) et biochimique de 350 souches de provenance très variée ; dans chaque tableau seront mis en évidence les types classiques, atypiques et nouveaux (tableaux I, II, III).

I. — Sur 228 souches d'*E. coli* 111:B4 étudiées, nous avons trouvé :

1° *E. coli* 111:B4 (PP+), 183 fois :

180 fois des souches possédant les caractères décrits par Kauffmann et Dupont [4].

3 fois des souches mobiles atypiques ne produisant pas d'indole (provenant du Danemark).

2° *E. coli* 111:B4:12 (PP—), 37 fois :

19 fois des souches typiques (Kauffmann et Dupont).

13 fois des souches atypiques qui diffèrent du type précédant par le caractère dulcitol —).

5 fois des *E. coli* 111:B4 immobiles qui possèdent les caractères biochimiques des 111:B4:12 sauf le pouvoir de faire fermenter la salicine.

3° *E. coli* 111:B4:21 (PP—), 10 fois.

Ces souches constituent un nouveau type, non encore décrit. Elles proviennent toutes d'Italie (Palerme) : elles ne font fermenter ni l'adoni'ol, ni l'inositol. La fermentation du mannitol et de la salicine est variable.

4° *E. coli* 111:B4: ? — Une souche, isolée à Paris, ne fait pas fermenter le dulcitol, l'adonitol, l'inositol, ne produit pas d'indole, utilise le citrate, produit de l'hydrogène sulfuré et possède un antigène H non identifié différent des antigènes H numérotés de 1 à 22 (caractères antigéniques d'*E. coli* et caractères biochimiques d'*E. freundii*).

Remarques : 1° Il nous paraît intéressant de noter que parmi les cultures qui ne donnent pas la réaction phényl-propionique, les types biochimiques III, IV et V ne font pas fermenter le saccharose, tandis que les types VI et VII attaquent ce glucide

TABLEAU I. — Caractères des souches du groupe 111 : B4.

Formule antigénique	111:B4:2		111:B4:12		111:B4 immobile	111:B4:21	111:B4:?
Types	I	II	III	IV	V	VI	VII
Urée	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	-	+	+	+	+	-
Xylose	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Arabinose	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Glucose	+1 G	+1 G	+1 G	+1 G	+1 G	+1 G	+1 G
Mannitol	+1	+1	+1	+1	+1	+	+1
Dulcitol	+2-7	+2-7	+2-4	-30	+2-5	+2	-30
Lactose	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Maltose	+1	+1	+1	+1	+2	+1	+1
Saccharose	+2-5	+2-5	-30	-30	-30	+1	+1
d-tartrate	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-30	-30	-30	-30	-30	-30	-30
Sorbose	-30	-30	-30	-30	-30	+1	+1
Tréhalose	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Sorbitol	+2	+2	+1	+1	+2	+1	+1
Salicine	+2-7	+2	+2	+2	-30	-30	+3
Inositol	-30	-30	-30	-30	-30	-30	-30
Gélose au plomb	-	-	-	-	-	-	+
Gélatine	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	+
V.P.	-	-	-	-	-	-	-
R.M.	+	+	+	+	+	+	+
Stern-Glycérol	-	-	-	-	-	-	-
P.P.	+	+	-	-	-	-	-
Nombre de souches	180	3	19	13	5	10	1

Ces deux derniers types (PP—) se comportent donc à cet égard comme les 111: B4 (PP+).

2° Seuls parmi les 111: B4 les types biochimiques VI (111: B4: 21) et VII (111: B4: ?) font fermenter le sorbose.

II. — Sur 90 souches d'*E. coli* 55: B5 étudiées, nous avons trouvé :

1° *E. coli* 55: B5: 6. — 44 fois des souches typiques [Kauffmann et Dupont] (PP—).

2° *E. coli* 55: B5: 7. — 24 fois (PP—).

TABLEAU II. — Caractères des souches du groupe 55 : B5.

Form. antigénique	55:B5:6	55:B5:7	55:B5:1	55:B5:2	55:B5:2	55:B5:7	55:B5:1	55:B5:2
Types	A	B ₁	B ₂	B ₃	C	D	E	F
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Arabinose	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Glucose	+1 G	+1 G	+1 G	+1 G	+1 G	+1 G	+1 G	+1 G
Mannitol	+ 1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Dulcitol	+2 ⁺	+2	+3	-30	+1	-30	+2	-30
Lactose	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Maltose	X	X	+2	+1	+1	+1	+1	+1
Saccharose	+1	+1	+2	-30	-30	+1	+2	-30
d-tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-30	-30	-30	-30	-30	-30	-30	+1
Sorbose	+1	+2	+1	-30	-30	-30	+1	-30
Tréhalose	+1	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Sorbitol	-30	-30	+1	+1	+1	+2-4	+1	+1
Salicine	-30	-30	+3	-30	-30	+2-4	-30	-30
Inositol	-30	-30	-30	-30	-30	-30	-30	-30
Gélose au Pb.	-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatine	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
V.P.	-	-	-	-	-	-	-	-
R.M.	+	+	+	+	+	+	+	+
Stern-Glycérol	-	-	-	-	-	-	-	-
P.P.	-	-	-	-	-	+	-	-
Nbre de souches	44	2	1	1	2	14	24	1

3° *E. coli* 55: B5: 2. — 16 fois.

2 fois le type dulcitol +, salicine — (PP —).

14 fois des souches dulcitol —, salicine + (PP +).

Ces 14 souches avaient toutes la même origine, elles provenaient de Grande-Bretagne. Nous n'avons jamais trouvé ce type en France.

4° *E. coli* 55: B5 ? :

3 souches (PP —) provenant du Danemark.

1 souche (PP —) provenant de Lille, très mobile possédant un antigène H différent des antigènes H. numérotés de 1 à 22.

TABLEAU III. — Caractères des souches du groupe 26 : B6.

Formule antigénique	26:B6:11		26:B6 immobile	26:B6:?
Type biochimique	Type 2 d'Orskov	atypique	Type 1 d'Orskov	Type 3 d'Orskov
Urée	-	+	-	-
Indole	+	+	+	+
Xylose	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
Arabinose	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
Glucose	+ 1 G	+ 1 G	+ 1 G	+ 1
Mannitol	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
Dulcitol	- 30	- 30	+ 2-4	- 30
Lactose	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
Maltose	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
Saccharose	+ 1	+ 1	+ 2	+ 2
d-tartrate	-	-	-	-
adonitol	- 30	- 30	- 30	- 30
Sorbose	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
Tréhalose	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
Sorbitol	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
Salicine	X	+ 5	+ 2	+ 2
Inositol	- 30	- 30	- 30	- 30
Gélose au plomb	-	-	-	-
Gélatine	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-
V.P.	-	-	-	-
R.M.	+	+	+	+
Stern-glycérol	-	-	-	-
P.P.	-	-	-	-
Nombre des souches	12	1	15	3

5° *E. coli* 55: B5: 11 (PP —), 1 fois, 1 souche isolée à Paris.

6° *E. coli* 55: B5: 21 (PP —), 1 souche transmise par Smith.

III. — Sur 31 souches d'*E. coli* 26: B6 (toutes PP —) nous avons trouvé :

1° 26: B6: 11 :

12 fois le type 2 d'Orskov [44].

1 fois une souche atypique urée +.

2° 26: B6 immobiles :

15 fois le type 1 d'Orskov.

3 fois le type 3 d'Orskov.

En France, le nombre des *E. coli* 111: B4 isolés des selles de nourrissons est beaucoup plus élevé que celui des *E. coli* 55: B5 : le type 26: B6 est le plus rare.

Les antigènes flagellaires H₂ pour le groupe 111: B4 et H₆ pour le groupe 55: B5 sont les plus courants. Ces deux types ont été souvent isolés au cours d'épidémies. Par contre, nous n'avons jamais isolé *E. coli* 26: B6 au cours d'épidémies, mais uniquement dans des cas sporadiques.

On trouvera la bibliographie complète des divers travaux sur les *E. coli* de gastro-entérite dans le travail de Simone Le Minor : « Etude bactériologique d'*Escherichia coli* isolés au cours de gastro-entérites infantiles », Thèse Pharmacie, Paris, 20 juin 1953, et dans celui de O. H. Braun : *Ergebn. inneren Med. Kinderheilk.*, 1953, 4, 53.

Nous ne rapporterons ici que les travaux des auteurs cités dans notre texte.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. D'ALESSANDRO et R. COMES. *Bolletino I. S. M.*, 1952, 31, 291.
- [2] CRAIGIE. *J. Immunol.*, 1931, 21, 417.
- [3] F. KAUFFMANN. *J. Immunol.*, 1947, 57, 71.
- [4] F. KAUFFMANN et A. DUPONT. *Acta path. microb. scand.*, 1950, 27, 552.
- [5] F. KAUFFMANN. *Enterobacteriaceae*. Munksgaard. édit. Copenhague, 1951.
- [6] F. KAUFFMANN. *Acta path. microb. scand.*, 1952, 31, 355.
- [7] H. E. KNIPSCHILDT. *Undersogelser over Coli-Gruppen Serologi*. Nyt. Nordisk Forlag, Arnold Busck, Copenhague, 1945.
- [8] KREPLER et ZISCHKA. *Oest. Zeitschr. Kinderheilk.*, 1952, 7, 89.
- [9] G. LAURELL. *Nordisk Medicin*, 1952, n° 7, 204.
- [10] J. OLARTE et G. VARELA. *J. Labor. Clin. Med.*, 1952, 40, 252.
- [11] F. ORSKOV. *Acta path. microb. scand.*, 1951, 29, 373.
- [12] F. ORSKOV, E. E. SCHMID et T. VELAUDAPILLAI. *Acta path. microb. scand.*, 1953, 32, 565.
- [13] F. ROLAND, D. BOURBON et S. SZTUM. *Ces Annales*, 1947, 73, 914.
- [14] G. VARELA, A. AGUIRRE et J. CARILLO. *Bol. medico Hospital Infantil Mexico*, 1946, 3, 3-7.
- [15] VAHLNE. *Serological typing of the colon bacteria*. Gleerupska Univ.-Bokhandeln. Lund, 1945.
- [16] WRIGHT et VILLANUEVA. *J. Hyg.*, 1953, 51, 39.
- [17] C. ALIMANESTIANU-BUTAS, E. POTVIN et W. LACHANCE. *Canad. J. publ. Health*, 1953, 44, 245.

ISOLEMENT D'UN VIRUS ENCÉPHALOMYÉLITIQUE A BRAZZAVILLE.

III. — CULTURE SUR ŒUF EMBRYONNÉ ET CONCLUSIONS

par Aimé PELLISSIER (*).

(Institut Pasteur de Brazzaville.)

Nous avons rapporté ici même [1, 2, 3] l'étude épidémiologique, expérimentale et immunologique du virus de l'encéphalomyélite de Brazzaville. Nous donnons aujourd'hui les résultats de la culture de ce virus sur embryon de poulet. Nous terminerons enfin par les conclusions générales qui se dégagent de l'étude de cet intéressant virus.

CULTURE EN ŒUF EMBRYONNÉ.

Pour la pratique de cette culture nous nous sommes servi des précieux renseignements donnés par Beveridge et Burnet [4] et par P. Lépine [5]. Nous avons utilisé l'inoculation sur la membrane chorio-allantoïde, utilisée pour la première fois pour l'étude du virus de la variole aviaire par Woodruff et Goodpasture [6] en 1931 ; et l'inoculation dans le sac vitellin utilisée pour la première fois en 1938, pour les rickettsies, par Barykine et coll. [7] et Cox [8].

PASSAGES SUR MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDE.

Nous avons utilisé la méthode aveugle simplifiée, dérivée de la méthode de Beveridge, et indiquée par P. Lépine [5]. L'œuf est incubé pendant douze jours en position horizontale. Par mirage on note une région où la membrane chorio-allantoïde est bien développée et on marque au crayon sur la coquille un point de cette région choisi en dehors des vaisseaux. Après stérilisation de la coquille, on fait une perforation au niveau de la chambre à air, puis une perforation au niveau du point marqué. On fait sauter une infime parcelle de coquille, sans léser la membrane coquillière. On dépose une gouttelette d'inoculum sur cet orifice et

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 4 juin 1953.

on perfore délicatement la membrane coquillière à travers cette gouttelette, avec l'aiguille de la seringue (seringue à tuberculine). En général la dépression causée par le trou fait au niveau de la chambre à air aspire l'inoculum, qui va se répandre sur la chorio-allantoïde. Il est quelquefois nécessaire de pratiquer une légère aspiration au niveau du trou de la chambre à air, avec une tétine de compte-gouttes par exemple, pour obtenir l'aspiration de l'inoculum. Les deux orifices sont ensuite obturés avec 1 goutte de paraffine fondue stérile.

Nous avons fait 3 passages successifs sur chorio-allantoïde et obtenu la mort de 3 sur 5 embryons inoculés au cinquième jour, avec des lésions de congestion hémorragique diffuses sur les membranes et chez l'embryon.

Nous n'avons malheureusement pas pu poursuivre ces passages pour des raisons matérielles. Ne disposant que d'un petit nombre d'œufs à inoculer chaque semaine et poursuivant parallèlement des inoculations de rickettsies en sac vitellin, nous avons été amené à nous en tenir à un seul mode d'inoculation utilisable pour toutes nos expériences.

Quoique nous n'ayons pas fait la preuve de la culture du virus sur chorio-allantoïde par inoculation au singe, nous devons cependant penser que cette culture a eu lieu puisqu'elle a entraîné la mort des embryons.

INOCULATION DANS LE SAC VITELLIN.

Nous avons utilisé la méthode aveugle classique, après une incubation de cinq à six jours, en position verticale.

Nous avons effectué 8 passages successifs qui ont donné les résultats suivants :

NUMÉRO du passage	NOMBRE D'ŒUFS inoculés	NOMBRE D'EMBRYONS morts	DATE DE LA MORT
1 ^{er}	6	0	Sacrifiés le 9 ^e jour.
2 ^e	4	2	Morts le 9 ^e jour.
3 ^e	4	2	Morts le 4 ^e jour.
4 ^e	3	1	Mort le 9 ^e jour.
5 ^e	5	2	Morts le 7 ^e jour.
6 ^e	4	3	Morts le 8 ^e jour.
7 ^e	5	4	Morts le 7 ^e jour.
8 ^e	3	3	Morts le 7 ^e jour.

Il semble bien qu'à partir du cinquième passage la virulence se soit fixée, puisque pratiquement 8 à 10 sur 10 des embryons inoculés meurent vers le septième-huitième jour. Les lésions histologiques ne présentent aucun caractère particulier. Il s'agit

seulement d'une congestion diffuse du sac, des membranes et de l'embryon. Nous n'avons pas remarqué de lésions spéciales et nous n'avons pas trouvé d'inclusions.

Au quatrième passage sur embryon, nous avons inoculé le singe 371, par voie intracérébrale. Cet animal a présenté, après une incubation de quatorze jours, des tremblements et une poussée fébrile. Le seizième on notait une paraplégie flasque, le dix-huitième jour une quadriplégie et le singe mourait le vingt et unième jour. La preuve était faite que le virus cultivait sur embryon de poulet.

Le virus est présent dans le sac vitellin et dans tout l'embryon et les passages peuvent être effectués avec le sac ou l'embryon.

Nous avons procédé à un titrage, incomplet, du virus, et constaté que la dilution à 1/100 du sac vitellin donne la mort de 3 sur 3 embryons dans les délais normaux. Par contre, une dilution à 1/1 000 ne s'est pas montrée virulente.

Nous avons procédé à un essai de séro-neutralisation du virus embryon avec l'anti-sérum expérimental de lapin. L'épreuve est faite classiquement avec deux heures d'incubation du mélange à 37°. L'anti-sérum protège 4 sur 4 embryons inoculés avec le virus à 1/100 (dilution finale) et 2 sur 4 embryons avec le passage normal.

Nous n'avons pu poursuivre plus avant ces expériences, mais elles montrent d'ores et déjà :

- 1° La culture du virus sur embryon de poulet ;
- 2° L'absence d'autostérilisation du virus qui rendait difficile l'expérimentation chez le singe ;
- 3° La possibilité de pratiquer des tests de séro-neutralisation sur embryon de poulet, d'où la facilité de l'expérimentation à venir ;
- 4° L'espoir d'obtenir sur embryon, au bout d'un certain nombre de passages, un virus qui aura perdu sa virulence pour le singe et pour l'homme et qui pourra être utilisé comme vaccin.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Au terme de cette étude, il est intéressant de reprendre les principaux caractères du virus de l'encéphalomyélite de Brazzaville.

L'un des plus intéressants de ces caractères, sinon le plus troublant, est l'étroite analogie qui existe, en ce qui concerne le pouvoir pathogène naturel, l'épidémiologie et le pouvoir pathogène expérimental pour le singe, entre ce virus et les virus poliomyélitiques...

La *maladie naturelle*, si elle peut revêtir l'allure de méningite et de méningo-encéphalite, est capable de simuler exactement la

paralysie infantile. Et ceci s'est produit non seulement au cours de l'épidémie de 1951, mais encore au cours des petites poussées de 1952, au cours desquelles une centaine de cas africains et un cas européen ont été constatés.

L'épidémiologie est calquée sur celle de la poliomyélite et les facteurs secondaires, saisonniers, climatologiques, météorologiques et de moindre résistance individuelle, viennent activer la propagation du virus éliminé par les selles des malades.

Le pouvoir pathogène expérimental pour le singe reproduit d'une manière troublante la maladie naturelle, avec sa phase fébrile, grippale et sa phase paralytique apparaissant brusquement sous la forme de la paraplégie flasque du matin.

Mais l'étude histologique du système nerveux du singe montre les lésions d'une encéphalomyélite et non celles de la poliomyélite. On peut schématiser ainsi ces deux types de lésions. Dans la poliomyélite, il y a atteinte de la substance grise de la moelle, du bulbe et des noyaux gris de la base, sans diffusion aux autres régions du système nerveux. Le maximum de lésions est constaté au niveau des cornes antérieures de la moelle dont les neurones moteurs sont détruits par le virus, à la suite de quoi se produit une réaction inflammatoire de neuronophagie pour l'élimination des déchets neuronaux. Dans l'encéphalomyélite, au contraire, les lésions sont diffuses à tout le névraxe et ce sont des lésions surtout inflammatoires qui détruisent secondairement les éléments neuronaux.

Et de fait des signes encéphaliques sont retrouvés dans certains cas de la maladie naturelle, et chez certains singes qui présentent pendant quelques jours uniquement des signes d'encéphalite. Cette distinction histologique a de plus été amplement confirmée par l'existence d'une virémie chez le singe et par la culture du virus sur œuf embryonné.

Le virus s'est montré très régulièrement pathogène pour le singe et pratiquement pas pour la souris ni le cobaye. Cependant, il est très possible que l'utilisation de rongeurs sauvages récemment importés au laboratoire (hamster, mériem et sigmodon) permette une adaptation à ces rongeurs puis à la souris.

Par les épreuves de séro-neutralisation croisée et par les épreuves de fixation croisée du complément ce virus s'est montré différent de 4 autres virus neurotropes isolés à Brazzaville ou en A. E. F. et de 28 virus neurotropes divers. De par ces caractères particuliers, le virus de l'encéphalomyélite de Brazzaville est le virus encéphalomyélique le plus près des virus poliomyélitiques. Nous pensons que c'est bien la première fois qu'un virus encéphalomyélique est isolé des selles de jeunes malades atteints de paralysie infantile clinique.

Ce virus semble déjà être assez répandu en Afrique, si l'on en

juge par le pouvoir neutralisant du soi-disant sérum de convalescent de poliomyélite d'Angola. De toute façon, il semble qu'à Brazzaville et au Moyen-Congo (réactions de déviation du complément effectuées en enquête), il gagne du terrain chaque année.

A ce sujet, la culture du virus sur œuf embryonné permet d'envisager l'obtention, au bout d'un certain nombre de passages, d'un virus non pathogène, mais antigénique, qui pourrait être utilisé comme vaccin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. PELLISSIER et E. TRINQUIER. *Ces Annales*, 1953, **85**, 316.
- [2] et [3] A. PELLISSIER. *Ces Annales*, 1954, **86**, 53.
- [4] W. I. B. BEVERIDGE et F. M. BURNET. *La culture des virus et des rickettsies sur embryon de poulet*. Flammarion, éditeur, Paris, 1951.
- [5] P. LÉPINE. *Les ultravirus des maladies humaines*. Maloine, éditeur, Paris, 1948 ; *Bactériol. médicale*. Flammarion, éditeur, Paris, 1951.
- [6] A. M. WOODRUFF et E. W. GOODPASTURE. *Amer. J. Path.*, 1931, **7**, 209.
- [7] W. BARYKINE et coll. *Bull. Off. Intern. Hyg. publ.*, 1938, **30**, 326.
- [8] H. R. COX. *Publ. Health Rep.*, 1938, **53**, 2241.

ANTICORPS BLOQUANT DANS LE SÉRUM DE SUJETS BRUCELLIQUES

V. — IMPORTANCE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE CAPRINE

par G. RENOUX (*).

(Institut Pasteur, Tunis.)

Le diagnostic de la brucellose chez l'animal ne demande pas exactement les mêmes critères que ceux exigés pour l'homme.

Dans le cas de la brucellose humaine, et de ce point de vue, le problème est proche de celui rencontré pour la tuberculose, il s'agit de rapporter à leur cause actuelle les symptômes observés. Que l'individu ait été en contact ou non avec *Brucella*, qu'il héberge ou non ce microbe n'est pas ce qui importe au clinicien en présence d'un malade : il faut faire la preuve que les troubles dont souffre le patient sont bien dus à la « *brucellose-maladie* ». On ne saurait jamais être trop sévère sur cette preuve qu'en l'état actuel de la question seule une culture positive, à la rigueur un séro-diagnostic à taux suffisamment élevé, peut apporter, à l'exclusion de toute autre réaction.

Chez l'animal, il ne s'agit pas de faire le diagnostic d'un état morbide actuel afin d'instaurer une thérapeutique correcte et active, l'objectif est d'éliminer d'un troupeau tous les animaux excréteurs ou porteurs de *Brucella*.

L'anticorps bloquant que l'on trouve dans certains sérums de sujets brucelliques [1, 2, 3, 4] peut aider à résoudre ce problème important pour l'épidémiologie et la prophylaxie de la brucellose animale, plus particulièrement caprine.

MÉTHODE.

C'est celle exposée dans une publication antérieure [1]. On pratique un séro-diagnostic de Wright selon la technique habituelle :

Dilutions du sérum frais en eau salée à 0,85 p. 100 du 1/5 au 1/5 120, sous un volume uniforme de 0,5 ml. On ajoute alors à chaque tube, au rhéomètre, 0,5 ml de la suspension antigénique (souche « S.6 smooth », étalonnée par le sérum Etalon Interna-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} octobre 1953.

tional OMS/OIE : ++ 1/720), ce qui donne des dilutions finales du sérum suspect comprises entre 1 : 10 et 1 : 10 240.

Le portoir contenant ces dix tubes (plus un tube témoin contenant 0,5 cm³ d'eau salée et 0,5 cm³ d'antigène) est porté, une nuit, à l'étuve à 37°. Le lendemain, on lit la réaction. Si aucune agglutination ne s'est produite, on recherche l'anticorps bloquant en ajoutant à chaque tube de la réaction, y compris le tube témoin, 0,1 cm³ d'un sérum sûrement agglutinant pour *Brucella*, en sorte que la dilution finale de ce sérum soit de 1/100. On porte de nouveau à l'étuve à 37° et après dix-huit heures on lit la réaction.

La présence d'anticorps bloquant se traduit alors par l'absence d'agglutination dans un ou plusieurs tubes des plus faibles dilutions.

On peut faire cette recherche au moyen d'un sérum antiglobuline qu'on fera agir sur la suspension microbienne sensibilisée par le sérum suspect et lavée soigneusement. Cette deuxième technique est généralement plus sensible, donne des titres plus élevés. Elle a l'inconvénient d'être plus longue, plus difficile et d'exiger autant de sérums « antiglobuline » qu'il y a d'espèces animales qui ont fourni les sérums à éprouver.

RÉSULTATS.

Nous avons appliqué cette méthode aux sérums de quelques chèvres qui, faisant partie d'un troupeau sûrement infecté (agglutinations et cultures positives), avaient un séro-diagnostic négatif.

Le tableau I présente les résultats de la recherche des anticorps bloquants chez 14 caprins (2 mâles, 12 femelles) à séro-diagnostic négatif, en même temps que les résultats globaux des cultures faites sur ces animaux ; 12 d'entre eux ont été autopsiés et des échantillons de divers tissus ou organes mis en culture : les résultats détaillés de ces cultures sont exposés ailleurs [5].

Les hémocultures et lactocultures, dont seuls sont donnés ici les résultats globaux, ont été répétées à une semaine d'intervalle, trois fois pour les hémocultures, quatre fois pour les lactocultures.

Chez quelques autres chèvres, il nous a été permis de voir une sorte d'échange, de balancement entre l'agglutinine et l'anticorps bloquant [4]. Ainsi les quatre chèvres suivantes, éprouvées à une semaine d'intervalle (V. tableau II).

Éprouvés seulement par la technique classique du séro-diagnostic de Wright, ces sérums auraient pu, selon le moment du prélèvement, être classés négatifs ; la présence d'anticorps bloquant à de tels moments nous explique ce phénomène souvent constaté, jusqu'ici inexpliqué, d'animaux tantôt positifs, tantôt négatifs à la réaction d'agglutination.

TABLEAU I. — Titre de l'anticorps bloquant et résultat des cultures.

N° de l'animal	Sexe	Titre anticorps bloquant	Cultures		
			sang	Lait	Tissus
365	M	20	-		+
369	F	40	-	+	+
370	F	10	+	-	+
371	F	20	+	+	+
373	F	20	-	+	+
384	F	40	-	+	+
386	M	20	+		+
387	F	40	-	+	+
388	F	10	-	-	+
389	F	10	+	-	
390	F	20	+	+	+
393	F	40	-	-	+
396	F	20	-	-	+
400	F	20	+	-	+

TABLEAU II.

N°	Examens			
	1	2	3	4
363	<u>20</u>	80	80	<u>80</u>
380	<u>10</u>	<u>80</u>	80	<u>80</u>
381	<u>10</u>	<u>10</u>	40	20
382	<u>20</u>	<u>10</u>	20	10

80, titre d'agglutination; 80 titre d'agglutination avec « zone », 80, titre d'anticorps bloquant.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Le nombre d'animaux qui ont servi à cet essai est trop faible pour permettre d'être absolument affirmatif. Cependant, la convergence de ces résultats nous permet, croyons-nous, un certain nombre de conclusions, au moins provisoires.

Il est facile d'affirmer qu'un troupeau de chèvres est infecté par la brucellose ; il est admis, à juste titre, que la présence d'un animal réagissant dans un troupeau (séro-diagnostic à un titre conclusif, ou cultures positives) suffit à indiquer l'infection de ce troupeau [6]. L'épreuve de l'anneau sur le lait [7] permet également ce diagnostic de groupe. La difficulté devient plus grande lorsqu'il s'agit du diagnostic individuel de la maladie ou plus exactement de la présence de *Brucella* dans l'organisme d'un

animal donné. Cette notion est cependant importante pour permettre d'éliminer la brucellose d'un troupeau par suppression de tous les animaux porteurs de germes, quel que soit leur état actuel. On reconnaît que le séro-diagnostic n'est pas suffisant, trop nombreux étant les exemples de chèvres à culture positive dont la réaction d'agglutination est négative.

Le dépistage par cultures systématiques et répétées de sang et de lait est une méthode absolument inapplicable dans les conditions de la pratique. La recherche de l'allergie spécifique par intradermo-réaction, à la mélitine par exemple, se heurte en pratique au fait qu'elle nécessite un double déplacement du personnel, l'un pour pratiquer la réaction, l'autre pour la lire. De plus, l'appréciation de cette réaction est essentiellement subjective, il faut quelqu'un de très entraîné pour éviter des erreurs parfois grossières. Ces considérations limitent donc l'emploi de cette épreuve, qui nous paraît avoir la même valeur que la recherche de l'anticorps bloquant.

Ainsi, si des essais répétés et étendus à un nombre suffisant d'animaux confirmaient les premiers résultats obtenus, c'est-à-dire la coïncidence d'une réaction « anticorps bloquant » positive avec des cultures de sang, de lait ou d'organes positives pour *Brucella*, nous aurions une épreuve simple, facile à exécuter qui permettrait le dépistage individuel de la brucellose caprine.

Cette notion nouvelle, confirmée, répétons-le, modifierait considérablement la lutte contre la brucellose caprine, qu'on s'attache à faire disparaître cette maladie par éradication ou par vaccination.

Cette étude mériterait sans doute d'être étendue aux autres espèces animales.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. RENOUX. *Ces Annales*, 1950, **78**, 798.
- [2] G. RENOUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 232.
- [3] L. CARRÈRE et G. RENOUX. *Ces Annales*, 1951, **80**, 103.
- [4] G. RENOUX. *Ces Annales*, 1954, **86**, 91.
- [5] G. RENOUX et H. RAGAZHI AZAR. *Revue Path. gen.*, 1953 (sous presse).
- [6] *Organisation mondiale de la Santé. Série Rapp. techn.*, 1951, **37**, et 1953, **67**.
- [7] G. RENOUX et G. CORDIER. *Revue Immunol.*, 1952, **16**, 312.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 11^e.)

Séance du 3 Décembre 1953.

Présidence de M. GASTINEL

COMMUNICATIONS

VALEUR DE L'AZIDE DE SODIUM POUR L'ISOLEMENT DES ANAÉROBIES

par A.-R. PRÉVOT et H. THOUVENOT.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Malgré les progrès considérables réalisés depuis trente ans dans la technique d'isolement des anaérobies à partir des échantillons polymicrobiens, on ne réussit pas toujours à les obtenir rapidement en culture pure. Il existe même des cas, encore relativement nombreux, où, dominés d'emblée par les aérobies dans les milieux solides d'isolement, on n'arrive pas à les en séparer. Tel est le cas des boues, des eaux, de la terre et de certains produits pathologiques où ils sont en minorité. De nombreuses recherches ont déjà été effectuées pour essayer d'améliorer les techniques classiques, mais jusqu'ici aucune n'a donné de très bons résultats. Nous avons voulu voir si l'addition aux géloses profondes d'azide de sodium, substance inhibant la respiration et par conséquent la croissance des aérobies [1], permettrait un isolement plus rapide des anaérobies à partir de divers matériels polymicrobiens où les aérobies étaient en proportion beaucoup plus élevée que les anaérobies.

Technique. — Nous employons une solution d'azide de sodium à 1 p. 1 000 stérilisée par filtration sur bougie, dont on distribue X gouttes par tube de gélose VF profonde glucosée après l'élimination de l'air de celle-ci par ébullition prolongée. On ensemence à la pipette fermée par agitation et épuisement une série de 12 tubes comme dans la technique classique. Nous avons ainsi étudié 100 matériels répartis de la façon suivante : 39 contenus d'intestins de poissons ; 32 prélèvements de végétaux en putréfaction ; 24 prélèvements de boues d'étang et d'eaux polluées ; 5 fromages fermentés.

Résultats. — Dans 58 cas, alors que les tubes témoins indiquaient une abondance d'aérobies et de facultatifs où les anaérobies étaient noyés, les géloses profondes additionnées d'azide ont donné lieu à la culture exclusive des anaérobies stricts, qu'il a suffi de repiquer, colonie par colonie, pour obtenir des lignées pures en vingt-quatre heures.

Dans 12 cas, les aérobies ont été inhibés, les facultatifs et les anaérobies stricts ont poussé ensemble et il a été relativement facile de résoudre ceux-ci par repiquage des colonies bien séparées.

Dans 15 cas, l'azide a empêché toute culture.

Dans 15 cas, l'azide n'a pas agi ou a agi trop faiblement et il n'a pas été possible d'isoler des anaérobies stricts.

Discussion. — On voit par cette première statistique que le processus d'inhibition des aérobies par l'azide n'est pas toujours absolu, puisque dans 27 p. 100 des cas il a laissé subsister des facultatifs.

Par contre, le processus d'inhibition peut s'étendre aux anaérobies, puisque, dans 15 p. 100 des cas, il a empêché toute culture. Son action sélective attendue, soit l'inhibition des aérobies et des facultatifs, s'est manifestée dans 58 p. 100 des cas. Par conséquent, il y a intérêt à utiliser cette technique. Nous devons signaler en passant que, dans 3 cas, le type respiratoire des anaérobies a été modifié par l'azide : des anaérobies du type I [2] ont présenté dans les géloses + azide la culture en disque suspendu dans la zone critique (type IV) mais ont repris le type I par repiquage en gélose VF glucosée ordinaire.

Conclusions. — L'addition d'azide de sodium aux géloses profondes permet un meilleur isolement des anaérobies stricts dans 70 p. 100 des cas (58 p. 100 d'action sélective absolue ne laissant pousser que des anaérobies stricts et 12 p. 100 d'action sélective relative favorisant les anaérobies stricts). Elle échoue dans 30 p. 100 des cas (15 p. 100 de stérilisation absolue du matériel, 15 p. 100 de résultats nuls).

L'azide de sodium est capable de modifier transitoirement le type respiratoire des bactéries anaérobies.

BIBLIOGRAPHIE

[4] K. R. JOHANSSON. *J. Bact.*, 1953, **65**, 225.

[2] A.-R. PRÉVOT. *Bull. Soc. Phil. Paris*, 1938, **121**, 80.

ÉTUDE D'UN ANAÉROBIE DU SPERME DU TAUREAU ET DU VAGIN DE LA VACHE *VIBRIO BUBULUS FLORENT* 1953

par H. THOUVENOT et A. FLORENT.

(Service des Anaérobies. Institut Pasteur, Paris,
et Laboratoire de Recherches Vétérinaires de l'Etat, Uccle-Bruzelles.)

La diffusion en Belgique de la vibriose, affection dont le caractère vénérien est à présent bien connu, a amené l'un de nous à rechercher

Vibrio foetus aussi bien dans les spermes de taureaux que dans le produit de sécrétion du vagin de vaches suspectes de contamination. Il a, dans deux précédentes notes [1 et 2] signalé la découverte, à cette occasion, de vibrions susceptibles d'être confondus de prime abord avec *Vibrio foetus*, dont il diffère cependant par plus d'un côté.

Le but de la présente note est de faire connaître d'une façon plus précise les caractères sur la foi desquels nous pourrions nous baser pour affirmer qu'il s'agit non seulement d'un vibron différent de *Vibrio foetus*, mais d'une espèce nouvelle, jusqu'ici non décrite.

Notre étude a porté sur quatre souches isolées du sperme de 4 taureaux différents. En gélose profonde, ces souches se présentent comme des anaérobies stricts. Si nous voulons les comparer sous ce rapport à *V. foetus*, nous rappellerons que ce dernier ne présente pas un type respiratoire uniforme, puisque sur neuf souches étudiées par R. Vincent, A.-R. Prévot et H. Thouvenot [3], trois se présentaient comme des aérobies stricts (type VII de Prévot) [4], cinq comme des anaérobies microaérophiles (type II de Prévot), et une comme un anaérobie strict du type VI évoluant secondairement vers le type II. Nos quatre souches (♯ Impérial, ♯ Mix, ♯ Atome, ♯ Waterloo) pouvaient donc *a priori* appartenir au type respiratoire II anaérobie de *V. foetus*.

Aussi avons-nous demandé à notre collègue, le Dr Gallut (1), de comparer la structure antigénique de nos souches avec celle de *V. foetus*. Mais aucune de nos souches ne fut agglutinée par les sérums anti-*V. foetus* de Gallut et réciproquement, un sérum anti-♯ Waterloo qui agglutine les souches ♯ Atome et ♯ Impérial n'agglutine pas *V. foetus*. Ainsi la diagnose de ces souches s'est nettement orientée vers le groupe des vibrions anaérobies. Après leur étude morphologique, physiologique et biochimique complète, nous avons conclu qu'il s'agissait d'une espèce nouvelle dont voici la description :

Habitat : Sperme de taureau et vagin de la vache (2).

Morphologie : Petit bâtonnet incurvé en virgule, long de $1,5 \mu$ sur $0,3$ à $0,4 \mu$ de large, le plus souvent isolé, parfois en paires, rarement en chaînettes. Quand il se présente en paires ou en chaînettes, chacun des éléments alterne sa concavité avec la convexité du suivant, prenant ainsi un aspect de spirille. Dans les vieilles cultures apparaissent des formes en boucles et en boules. Très mobile, il présente des mouvements très particuliers ; se dirigeant d'abord très vite dans une direction rectiligne, il s'arrête brusquement, semble hésiter puis revient en arrière sans s'être retourné, pour s'arrêter de nouveau, repartir dans une autre direction rectiligne, s'arrêter, revenir en arrière, dessinant une sorte d'aller et retour avec léger arrêt à chaque changement de direction. Ces mouvements s'observent particulièrement bien à l'ultramicroscope.

La ciliature est difficile à colorer ; néanmoins, par la méthode de

(1) Chef du Laboratoire du Choléra, à qui nous exprimons notre plus vive gratitude.

(2) Il est vraisemblable que l'habitat primitif de cette espèce est le smegma du taureau d'où il passe ensuite dans le sperme, puis dans le vagin de la vache. Des recherches en cours nous permettront d'établir si cette hypothèse est exacte.

Casarès-Gil, on peut mettre en évidence un cil polaire unique, long et possédant 2 à 5 ondulations très larges (fig. 1). Par photomicrographie électronique (fig. 2) il semble bien que ce cil soit polaire et unique. Il est asporulé et Gram-négatif.

Physiologie : Anaérobie strict, soit de type I au début, évoluant peu à peu vers le type II au fur et à mesure des repiquages, soit d'emblée de type II. Thermorésistance nulle. Longévité de plusieurs semaines sans repiquage, de plusieurs mois après repiquage. Pouvoir réducteur très faible : trois souches ne réduisaient ni safranine, ni rouge neutre,

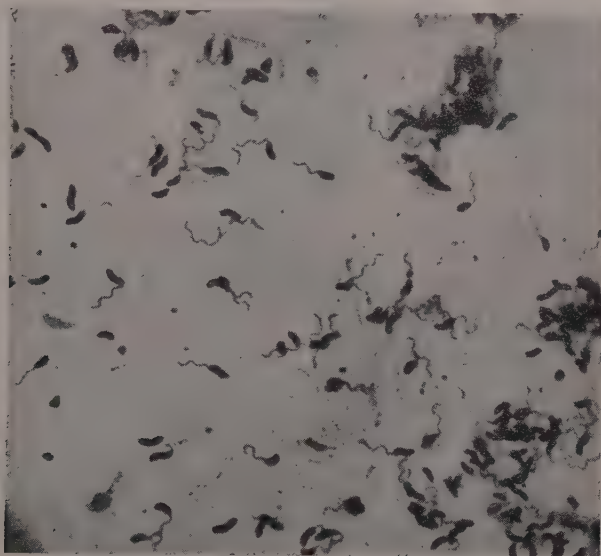


FIG. 1. — *V. bubulus*. Coloration Casarès-Gil.
Gross. : $\times 1\ 200$. Microphotographie P. Manigault.

ni phéno-safranine, la souche « Impérial » réduisait partiellement et tardivement la phéno-safranine seulement ($rH_i \geq 5,8$). Non sérophile.

Cultures : Rapides en bouillon VF mais peu abondantes, non gazo-gènes, d'odeur sulfhydrique nette.

Gélose profonde : colonies ouatées de 1 à 2 mm de diamètre, translucides, parfois à centre opaque brunissant à la longue.

Eau peptonée : léger trouble.

Bouillon VF glucosé : trouble plus abondant ; odeur sulfhydrique.

Gélatine : culture abondante mais absence de liquéfaction.

Lait : non coagulé ni digéré.

Bouillon + cervelle : culture abondante.

Protéines coagulées : non attaquées.

Glucides : non fermentés.

Propriétés biochimiques : Les nitrates sont réduits en nitrites. Les

sulfates et les sulfites ne sont pas attaqués. En bouillon VF, il y a production d' SH_2 , d' NH_3 , d'acide acétique et de traces d'acide lactique.

Pouvoir pathogène : Nul pour cobaye et souris ; pas de toxine, ni d'hémolysine.

Position dans la systématique : La description ci-dessus montre qu'il



FIG. 2. — Microphotographie électronique.
Gross. : $\times 15\ 000$. Giuntini et M^{lle} Croissant.

s'agit bien d'un vibron anaérobie. Il est donc à comparer avec les 11 espèces anaérobies connues de ce genre [5]. Etant non gazogène, il appartient au groupe A. La comparaison de ses caractères morphologiques et culturels avec ceux des espèces : *V. stomatitis*, *V. buccalis*, *V. putridus*, *V. pseudospirochaeta*, *V. polymorphus*, *V. tenuis*, *V. sputorum* et *V. sputigenus* montre aisément qu'il ne répond à aucune de ces espèces. Il n'appartient pas non plus à *V. crassus* dont une étude récente a révélé le caractère gazogène qui le place dans le groupe B [6].

Par contre, il est voisin de *V. mulieris* (Curtiss) Prévot, isolé dans l'appareil génital de la femme. Mais celui-ci est sérophile obligatoire, présente des colonies punctiformes en gélose profonde, ne pousse pas en gélatine, ni en lait, soit quatre caractères différentiels très nets qui l'opposent à nos souches. Nous pensons donc qu'il s'agit d'une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le nom de *Vibrio bubulus*. Il sera intéressant, si on retrouve une souche de *V. mulieris*, de compléter la description de ce dernier afin de comparer ses caractères biochimiques non encore connus avec ceux de *V. bubulus*. Il sera également nécessaire de comparer la structure antigénique de ces deux espèces. La lyophilisation de nos souches permettra de les conserver et de les soumettre ultérieurement à ces examens.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] et [2] A. FLORENT. *C. R. Soc. Belge Biol.*, 1953, Séance du 31 octobre (sous presse).
- [3] R. VINZENT, A.-R. PRÉVOT et H. THOUVENOT. *Ces Annales*, 1952, **83**, 266.
- [4] A.-R. PRÉVOT. *Bull. Soc. Phil. Paris*, 1938, **121**, 80.
- [5] A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édition, Paris, 1948, 118 à 124.
- [6] H. BEERENS et N. ALADAME. *Ces Annales*, 1948, **75**, 391.

**TECHNIQUE D'ISOLEMENT
DES BACTÉRIES ANAÉROBIES URÉOLYTIQUES.
DESCRIPTION D'UNE ESPÈCE NOUVELLE
ISOLÉE PAR CETTE MÉTHODE**

par M. HUET et F. DE CADORE.

(Institut Pasteur de Tunis et Institut Pasteur de Paris,
Service des Anaérobies.)

Malgré leur activité fermentaire considérable, les bactéries anaérobies comprennent un nombre relativement restreint d'espèces uréolytiques puisque, jusqu'à ce moment, quatre espèces seulement sont connues comme possédant cette propriété. De plus, si nous considérons une de ces espèces, *Clostridium sordellii*, nous voyons que les collections microbiologiques ne possèdent qu'un nombre très limité de souches de cet agent d'une gangrène gazeuse très grave. Il nous a donc semblé intéressant de mettre au point un milieu qui permette de repérer les colonies de bactéries uréolytiques parmi les différentes colonies anaérobies se développant à partir d'un ensemencement quelconque polymicrobien.

La technique utilisée est la suivante : on prépare, à partir de bouillon VF non glucosé, un milieu solide, gélifié à 20 p. 1 000, ajusté

à pH 7 et auquel on ajoute par litre 0,8 ml d'une solution à 1,5 p. 100 de bleu de bromothymol dans l'alcool. Ce milieu est réparti en culot dans des tubes de 22, à raison de 20 ml par tube, et stérilisé à l'autoclave. Au moment de l'emploi, on régénère ce milieu par un chauffage de trente minutes au bain-marie bouillant, puis on ajoute à chaque tube, préalablement refroidi aux environs de 50°, 0,5 ml de la solution suivante :

Urée	40 g
PO ₄ KH ₂	4 g
PO ₄ K ₂ H	4 g
Eau distillée	Q.S 100 ml

Cette solution, ne pouvant être chauffée, est stérilisée par filtration sur bougie.

Le tube est alors ensemencé à partir d'un matériel polymicrobien quelconque et coulé dans le couvercle d'une boîte de Petri. Quelques mouvements circulaires suffisent à assurer un mélange parfait. Puis le fond de la boîte est placé dans le couvercle, concavité en dessus, emprisonnant une couche de gélose à l'abri de l'air, selon une technique analogue à celle de Boëz. Après vingt-quatre ou quarante-huit heures, temps nécessaire au développement des colonies, on observe les boîtes par transparence sur un fond blanc. Les bactéries non uréolytiques donnent des colonies jaunes ou blanches, tandis que celles libérant une uréase donnent des colonies d'un blanc bleuté entourées d'un halo bleu très visible. Ces colonies ainsi repérées sont repiquées et les souches obtenues purifiées selon les techniques propres aux bactéries anaérobies.

Nous avons pu ainsi et dès les premiers essais isoler à partir de fécès de mouton une espèce uréolytique, voisine d'*Eubacterium cadaveris*, mais qu'il convient de considérer comme une espèce nouvelle.

Il s'agit d'un gros bâtonnet (3 sur 0,8 μ) immobile, Gram-positif, non sporulé, granuleux, poussant très abondamment avec production de gaz en VF glucosé et donnant, en gélose profonde, des colonies irrégulières en flocons de neige. Il pousse mal en eau peptonée, coagule le lait, mais ne liquéfie pas la gélatine et n'attaque pas les protéines. Très réducteur, il réduit le rouge neutre, la safranine et la phénosafranine. Les lactose, maltose, lévulose, glucose, galactose sont attaqués ; les nitrates sont réduits en nitrites en présence de galactose et lactose. Notons encore la production abondante de SH₂ et la formation d'acides butyrique, acétique et lactique, d'amines volatiles et d'aldéhydes. Aucun pouvoir pathogène ne peut être mis en évidence.

Enfin cette bactérie produit une uréase extrêmement active, faisant virer le milieu de Ferguson en quelques secondes.

Proche d'*Eubacterium cadaveris*, ce germe s'en distingue par la non-liquéfaction de la gélatine, la non-production d'alcool et de cétones. Etant donné surtout que toutes les souches d'*Eubacterium cadaveris* que nous possédons sont absolument dépourvues d'activité uréolytique, nous pensons que cette bactérie doit être individualisée en une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le nom de : *Eubacterium ureolyticum*.

CONCLUSIONS. — 1° Une technique nouvelle est décrite permettant de repérer facilement les colonies de bactéries anaérobies uréolytiques : 2° Grâce à cette technique, une espèce nouvelle a été isolée. Elle est décrite sous le nom de : *Eubacterium ureolyticum*.

BIBLIOGRAPHIE

M. HUET et N. ALADAME. Ces *Annales*, 1952, **82**, 766.

H. TATAKI et M. HUET. Ces *Annales*, 1953, **84**, 890.

**SENSIBILITÉ AU VIRUS DE LA POLIOMYÉLITE *IN VITRO*
DES TISSUS DE DIFFÉRENTES ESPÈCES
DE SINGES D'AFRIQUE CENTRALE.
NON RÉCEPTIVITÉ
DES TISSUS DE CERTAINS MAMMIFÈRES**

par G. BARSKI, A. JEZISKI et P. LÉPINE.

(Institut Pasteur, Service des Virus
et Laboratoire vétérinaire de l'INEAC, Gabu Nioka, Congo belge.)

Depuis les travaux de Slater et Syverton [1], de Ledinko, Riordan et Melnick [2] et ceux de Youngner, Ward et Salk [3], on utilise largement pour la culture du virus poliomyélitique, les tissus prélevés sur le singe et cultivés *in vitro*.

Des cultures de tissus de même origine effectuées sur une plus grande échelle servent à l'heure actuelle à l'obtention d'importantes quantités de virus pouvant être éventuellement appliquées à la préparation d'un vaccin (Salk [4], Melnick et Riordan [5], Sabin [6], Gear [7], Miller [8]).

Le problème des limites zoologiques de la sensibilité tissulaire au virus poliomyélitique *in vitro* revêt, dans ces conditions, une importance particulière à la fois théorique et pratique.

Les singes employés jusqu'ici dans ce but appartiennent le plus souvent aux espèces asiatiques habituellement utilisées pour les recherches sur la poliomyélite, telles que *Macacus cynomolgus* (Slater et Syverton [1]) ou *Macaca mulatta* [2, 5, 8], et connues pour leur grande sensibilité à ce virus *in vivo* (Kling, Levaditi et Lépine [9]). Nous-mêmes avons employé avec succès pour ces cultures les tissus des cynocéphales (babouins) [10].

L'objet de cette étude a été avant tout d'explorer la possibilité d'emploi pour la culture du virus poliomyélitique de tissus de singes africains appartenant aux espèces les plus répandues dans la partie orientale du Congo belge et dans les régions limitrophes d'Afrique équatoriale française et d'Afrique orientale britannique.

En outre, nous rapportons ici les résultats d'essais de culture du virus

en présence de cellules provenant de sept espèces de mammifères autres que les simiens.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — Tous les singes utilisés au cours de ce travail ont été capturés ou abattus dans les galeries forestières de la région de Nioka (Congo belge, Province orientale), sauf les lémuriens (*Potto ibeanus*), capturés dans la forêt de l'Ituri à l'est de Stanleyville (Congo belge). Nous avons utilisé uniformément, dans tous les essais, des cultures de fibroblastes obtenues à la suite d'explantations de fragments de testicules prélevés sur des animaux jeunes en pleine croissance.

Les cultures de tissus de porc et de chauve-souris provenaient également des testicules. Pour les autres mammifères, nous nous sommes servis d'explants de tissu musculaire sous-cutané prélevés sur des embryons ou des animaux nouveau-nés.

La technique de culture de tissus a été décrite en détail précédemment [40]. Mentionnons seulement que, pour les cultures continues ayant pour but l'obtention de cultures secondaires, nous utilisons le milieu que nous nommons M27 contenant 20 p. 100 de sérum placentaire humain, 10 p. 100 d'extrait embryonnaire de bovin, 45 p. 100 de liquide amniotique de vache et 25 p. 100 de solution de Hanks. Les cultures primaires ou secondaires devant servir directement à l'introduction du virus sont faites dans le milieu recommandé par Enders [41] contenant 90 p. 100 de liquide amniotique, 5 p. 100 de sérum de cheval et 5 p. 100 d'extrait embryonnaire.

Dans tous les cas et quelle que soit l'espèce de l'animal donneur de tissu, nous avons obtenu avec ces milieux des cultures proliférantes et stables avec un minimum de dégénérescence non spécifique et, avec l'emploi du M27, des cultures particulièrement abondantes qui se prêtent bien à l'obtention de lignées cellulaires transplantables.

Pour éprouver la sensibilité de nos cultures au virus, nous utilisons toujours les trois souches poliomyélitiques-types, reçues, à l'origine, du Dr Jonas Salk et entretenues par la suite en culture de tissus au Service des Virus de l'Institut Pasteur de Paris. Ainsi nous avons employé la souche Mahoney (septième et huitième passage), la souche MEFl (vingtième et vingt et unième passage) et la souche Saukett (sixième passage).

Pour infecter les cultures, nous les incubons, avant d'introduire le milieu, pendant trente minutes à la température ambiante avec II gouttes de suspension virulente contenant environ 1 000 doses infectantes. Les tests de neutralisation sont faits soit avec des sérums spécifiques qui nous ont été aimablement fournis par le Dr Melnick, soit avec des sérums préparés par nous-mêmes sur le singe.

RÉSULTATS. — Nous donnons dans le tableau I un aperçu général des résultats obtenus avec les cultures directes (première génération cellulaire, sans repiquage) et les trois types de virus poliomyélitique. Le virus est introduit vers les dixième-douzième jours de culture et l'observation se poursuit pendant dix jours. La spécificité de l'effet cytopathogène est vérifiée sur des cultures parallèles où le virus est neutralisé avec des sérums spécifiques.

TABLEAU I.

Singe (espèce)	Croissance cellulaire (en 10 jours)	Effet cytopathogène*			Sensibilité à l'inoculation intracérébrale	
		Mah.	MEF1	Sauk.	Paralysie	Mort
<i>Cercopithecus eucampyx</i> (Fischer)	bonne	+++ en 3 j.	+++ en 4 j.	+++ en 3 j.	non éprouvée	
<i>Cercopithecus ascanius</i> <i>ascanius</i> (Audebert)	très bonne	+++ en 3 j.	+++ en 4 j.	+++ en 3 j.	non éprouvée	
<i>Cercopithecus mitis</i> (Wolf)	bonne	+++ en 3 j.	+++ en 3 j.	+++ en 3 j.	(Mah.) + en 6 j.	(Mah.) + en 12 j.
<i>Cercopithecus neglectus</i> (Schlegel)	très bonne	+++ en 2 j.	+++ en 2 j.	+++ en 2 j.	non éprouvée	
<i>Cercopithecus aethiops</i> <i>centralis</i> (Neumann)	très bonne	+++ en 2 j.	+++ en 3 j.	+++ en 2 j.	(MEF1) + en 7 j.	(MEF1) + en 12 j.
<i>Cercocebus opdenboschi</i> (Schouteden)	très bonne	+++ en 3 j.	+++ en 3 j.	+++ en 3 j.	non éprouvée	
<i>Colobus badius</i> Powellii (Matschie)	très bonne	+++ en 2 j.	+++ en 2 j.	+++ en 2 j.	non éprouvée	
<i>Colobus abyssinicus</i> <i>uellerensis</i> (Matschie)	très bonne	+++ en 3 j.	+++ en 3 j.	+++ en 3 j.	non éprouvée	
<i>Erythrocebus patas</i> <i>pyrrhonotus</i> (Hemprich, Ehrenberg)	bonne	+++ en 3 j.	+++ en 3 j.	+++ en 3 j.	(Mah.) + en 3 j.	(Mah.) + en 4 j.
<i>Perodicticus potto</i> <i>ibeanus</i> (Thomas)	très bonne	0	0	0	0	0

* +++ = effet cytopathogène caractérisé par la destruction de la totalité des fibroblastes présents dans la culture.

Pour les espèces de singes dont il nous a été possible de capturer des individus vivants, nous avons établi un parallélisme entre la réceptivité de l'animal à la poliomyélite inoculée par voie intracérébrale et la sensibilité de son tissu cultivé *in vitro*. Cette relation a été constatée chez deux espèces de cercopithèques et chez le singe rouge de la savane (*Erythrocebus*).

Contrairement à ce qui se passe pour les tissus des neuf espèces de singes vrais que nous avons éprouvées, les tissus du singe nocturne (lémurien), connu sous le nom de paresseux (*Perodicticus potto*), cultivés *in vitro* dans les mêmes conditions, manifestent une résistance complète au virus. Des cultures de trois générations successives de cellules dérivées de cet animal, mises chacune en présence des trois souches-types de virus de poliomyélite ne montrent aucun signe d'atteinte cellulaire. Le même résultat négatif est obtenu dans les cultures doubles où le tissu du *Perodicticus* est cultivé dans le même tube avec le tissu d'un autre singe sensible à la poliomyélite (*Colobus badius*). En plus, comme l'ont prouvé des expériences de transplantations dans ces cultures doubles, les cellules du paresseux sont inca-

pables de transmettre même passivement le virus à une autre culture sensible. A cette résistance cellulaire au virus *in vitro* correspond une insensibilité de cet animal au virus (souche Mahoney) inoculé par voie intracérébrale ; le même matériel s'est montré très virulent inoculé simultanément par la même voie aux cercopithèques.

Nous avons essayé, à Paris et à Gabu Nioka, toujours avec des résultats négatifs, de cultiver le virus de la poliomyélite, souches Mahoney et MEF1 : a) dans des cultures cellulaires provenant de testicules de porc et d'une espèce de chauve-souris [*Pipistrellus nanus* (Peters)], b) dans des cultures de tissu conjonctif sous-cutané et de l'épithélium rénal de lapin, enfin c) dans des cultures de tissu conjonctif embryonnaire de hamster, de souris, de vache et de chien. Pour ce dernier, nous avons employé des cultures d'explants tissulaires primaires ainsi qu'une souche de fibroblastes maintenue en culture pendant quatre mois et nous avons en outre, utilisé, comme nous l'avons fait pour le tissu du lémurien, des cultures doubles (association de tissu sensible et de tissu insensible au virus). Dans tous les cas, les cellules de chien sont restées complètement insensibles au virus et incapables de le transmettre même passivement d'une culture à l'autre.

CONCLUSION. — Les cultures cellulaires (fibroblastes) obtenues à la suite d'explantation *in vitro* de testicules prélevés sur neuf espèces de singes africains (cinq espèces de cercopithèques, deux espèces de colobes, le cercocèbe et le singe pleureur de savane (*Erythrocebus*), montrent toutes une nette sensibilité aux trois souches-types du virus : Mahoney (type I), MEF 1 (type II) et Saukett (type III). Cette sensibilité se manifeste par un effet cytopathogène qui est aussi complet et spécifique que celui obtenu précédemment avec le même matériel virulent sur des cultures de tissus humains ou de tissus testiculaires d'autres singes (cynocéphales) [8].

Pour certaines cultures (singes colobes), nous avons évalué par titrage la multiplication effective du virus dont le titre s'élevait dans ces cultures à 10^{-4} - 10^{-5} .

Nous avons établi également pour deux espèces de cercopithèques et pour l'érythrocebe la sensibilité au virus (souches Mahoney et MEF 1) inoculé par voie intracérébrale.

Ainsi nous étendons à neuf espèces nouvelles de simiens, dont certaines sont très répandues en Afrique centrale, la possibilité d'emploi de leurs tissus pour la culture du virus poliomyélitique *in vitro*.

En ce qui concerne la sensibilité au virus inoculé par voie intracérébrale, la liste de singes africains sensibles dressée par Pellissier et Audebaud [42] peut certainement être étendue et on doit y ajouter au moins encore quelques espèces de cercopithèques et le singe roux de savane (*Erythrocebus*) répandu dans les régions déboisées.

La réceptivité cellulaire *in vitro* au virus de la poliomyélite apparaît comme très strictement confinée parmi les primates, en dehors de l'homme, aux seuls singes vrais (*Simiæ*).

Les cellules provenant de singes nocturnes, lémurien (*Prosimii*) voisins des simiens dans la classification zoologique, se montrent entièrement insensibles au virus. De même sept autres espèces de

mammifères, la chauve-souris, la souris, le hamster, le lapin, le porc, la vache et le chien, ont montré la même absence de réceptivité cellulaire au virus de la poliomyélite.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. A. SLATER et J. T. SYVERTON. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **74**, 509.
- [2] N. LEDINKO, J. T. RIORDAN et J. L. MELNICK. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1951, **78**, 83.
- [3] J. S. YOUNGNER, E. N. WARD et J. E. SALK. *Amer. J. Hyg.*, 1952, **55**, 291.
- [4] J. E. SALK. *J. Amer. med. Ass.*, 1953, **151**, 1081.
- [5] J. L. MELNICK et J. T. RIORDAN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **81**, 208.
- [6] A. S. SABIN. *Communication personnelle*.
- [7] J. GEAR. *Communication personnelle*.
- [8] C. A. MILLER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **82**, 450.
- [9] C. KLING, C. LEVADITI et P. LÉPINE. *Bull. Acad. Méd.*, 1929, **102**, 158.
- [10] G. BARSKI, P. DE SOUZA, V. MONACI, M. ENDO et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1953, **85**, 576.
- [11] J. F. ENDERS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **82**, 100.
- [12] A. PELLISSIER et G. AUDEBAUD. *Ces Annales*, 1953, **84**, 1050.

UN CAS DE GÉNÉRALISATION DU FIBROME INFECTIEUX DE SHOPE

par H. JACOTOT, J. LEVADITI, A. VALLÉE et B. VIRAT.

(Institut Pasteur,
Services de Microbiologie animale et d'Anatomie pathologique.)

Dans le premier travail qu'il publia sur le fibrome infectieux, Shope spécifiait que ce pseudo-néoplasme ne se généralisait jamais et que son évolution se faisait sans atteinte de l'état général et sans manifestation fébrile [1]. Ultérieurement Ahlström et Andrewes ont pu réaliser un fibrome généralisé, mais en inoculant le virus par voie veineuse à des lapins qui, préalablement, avaient reçu par voie musculaire du goudron ou quelque hydrocarbure cancérigène [2].

Les observations qui ont été faites en France par dizaines de milliers au cours des derniers mois ont, d'une manière générale confirmé les assertions de Shope.

Sans doute, en ce qui concerne le premier point, a-t-on pu assister maintes fois au développement de la lésion vaccinale hors des proportions que lui assignaient les descriptions classiques ; sans doute a-t-on pu constater qu' *in situ* le fibrome initial, très fréquemment devenait lobulé ou se scindait ; sans doute faudrait-il rappeler que le premier malade étudié par Shope, un garenne « Sylvilagus » était porteur de trois fibromes ; il reste, si nous sommes bien informés, qu'aucun cas

de fibromatose généralisée n'a encore été signalé consécutivement à l'inoculation expérimentale du virus (1).

Nous en avons relevé un parmi 200 lapins auxquels nous avons inoculé du virus de Shope et chez lesquels les suites de l'inoculation ont été observées méthodiquement.

Observation du sujet : Le 3 juillet 1953 huit lapins reçoivent chacun, par voie testiculaire, 0,5 cm³ d'une suspension au 1/500 de virus de Shope, soit 0,25 cm³ dans chaque testicule. Une orchite double, plus accusée d'un côté que de l'autre, s'installe chez tous ; les phénomènes inflammatoires commenceront à régresser au cours de la troisième semaine, laissant, pour quelque temps, chez la plupart des animaux, des indurations du parenchyme ou du cordon ; chez trois des cinq qui pourront être observés jusque-là, les lésions disparaîtront au cours du troisième mois.

Chez l'un de ces lapins, le n° 868, le 28 juillet, c'est-à-dire vingt-cinq jours après l'inoculation, on a noté ceci : le testicule gauche n'est pas descendu ; le testicule droit, induré, a le volume d'une noix ; à sa surface le scrotum est sphacélé. Lorsqu'on examine l'animal le 5 août, donc une semaine plus tard, il est porteur de nombreuses métastases cutanées, exactement 24. Ces lésions siègent aux oreilles (8 et 3), à un membre antérieur (6), aux membres postérieurs (5), sur le dos (2) ; les plus grosses ont les dimensions d'une noisette, les plus petites, celles d'un grain de millet ; sur la moitié d'entre elles la peau est nécrosée ; certaines logées dans l'épaisseur des oreilles ont exactement l'apparence de lentilles. Il semble que les fibromes secondaires aient eu une évolution accélérée et que cette fibromatose se soit trouvée, lors de l'examen, dans sa phase de régression.

Le lendemain, l'animal mourait et l'autopsie mettait en évidence une pleuro-pneumonie pasteurellique massive avec omelette pleurétique englobant la totalité des lobes pulmonaires. La pasteurellose se présente assez fréquemment chez nos lapins neufs et chez ceux qui ont subi des inoculations diverses y compris les inoculations du virus de Shope. Nous avons le sentiment que, seule en cause, la fibromatose n'aurait pas gravement affecté l'état du lapin et qu'elle n'a pas contribué, ou bien peu, à entraîner la mort ; la pasteurellose y suffisait, mais peut-être la fibromatose a-t-elle favorisé son installation ?

Etude du matériel : Deux fibromes secondaires sont prélevés sur le cadavre pour examen histologique ; l'un (1°) siégeait à l'oreille, l'autre (2°) sur le dos. Voici brièvement transcrite la lecture des coupes qui y furent pratiquées :

1° Nodule fibromateux logé dans le derme, riche en fibroblastes et en histiocytes accompagnés de gros fragments irréguliers de collagène néoformé (Fig. 1) ;

2° Fibrome riche en vaisseaux et en histiocytes plus ou moins altérés [cette tumeur était en voie de nécrose] (Fig. 2).

(1) Parmi les lapins vaccinés avec le virus de Shope et qui sont exposés à la contamination par le virus de Sanarelli, il s'en trouve qui, insuffisamment immunisés, contractent une myxomatose plus ou moins grave avec formation de nombreux myxomes cutanés. On ne doit pas confondre ce processus avec une généralisation du fibrome vaccinal.

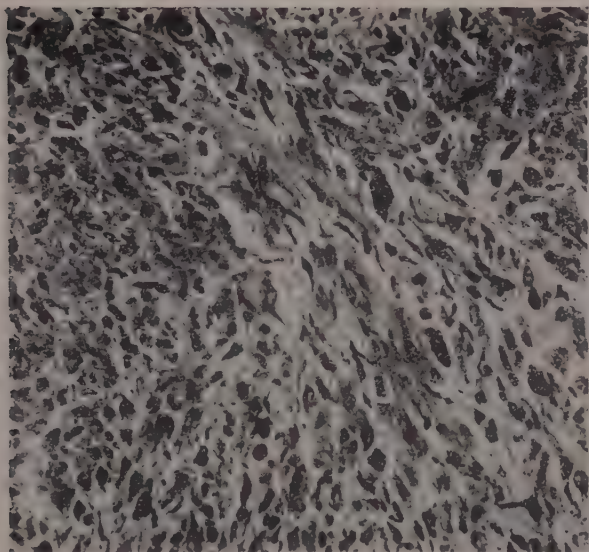


FIG. 1. — Coupe de fibrome secondaire, siégeant à l'oreille. (Gross. : $\times 210$.)

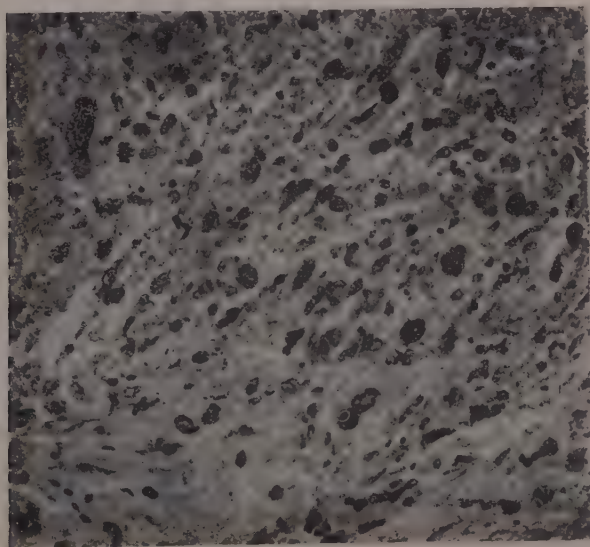


FIG. 2. — Coupe de fibrome secondaire siégeant sur le dos. (Gross. : $\times 210$.)

D'autre part, d'un fibrome secondaire prélevé à la face interne du jarret, on fait une suspension au 1/5 dont on injecte, après un séjour de deux semaines en sorbetière, à 4 lapins, par voie sous-cutanée, 0,5 cm³ derrière chaque épaule. Aux points d'inoculation se forment des fibromes dont les dimensions sont comprises entre celles d'un grain de blé et celles d'une amande. L'un des lapins, éprouvé un mois après par inoculation de virus de Sanarelli, contractera une myxomatose atténuée qui se terminera par la guérison. Sur un autre (n° 893) on prélève huit jours après l'inoculation un fibrome pour des passages ultérieurs.

Un mois après sa récolte le fibrome d'origine (lapin 868) est encore inoculé à 6 lapins par voies testiculaire et hypodermique, mais en suspensions au 1/50 ; chez tous ces animaux on observe dans la suite l'évolution de lésions fibromateuses caractéristiques, sans retentissement sur l'état général.

Le fibrome du 893 mentionné plus haut est mis en suspension au 1/50 pour inoculation à 6 lapins et au 1/100 pour inoculation à 12 lapins. C'est là le deuxième passage du virus de Shope issu de fibromatose généralisée. Même comportement que précédemment ; presque tous les lapins sont, huit ou dix jours après, porteurs d'une lésion grosse comme une petite noix. Trois d'entre eux résisteront à l'épreuve pratiquée cinq semaines plus tard par inoculation de virus du myxome infectieux. Sur deux autres enfin on prélève des fibromes qui sont employés, avec succès, à un troisième passage du virus.

En résumé, chez un lapin qui avait reçu du virus du fibrome de Shope par voie testiculaire nous avons observé, indépendamment des manifestations locales dont l'évolution fut normale, l'existence, après un mois, de 24 métastases fibromateuses réparties entre plusieurs régions du corps. Les examens histologiques, les passages en série et le test d'interférence avec le virus de Sanarelli ont confirmé l'étiologie de ces lésions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SHOPE. *J. exp. Med.*, 1932, **56**, 793.
- [2] AHLSTRÖM et ANDREWES. *J. Path. Bact.*, 1938, **47**, 65.

QUELQUES CARACTÈRES DE *SHIGELLA SONNEI* ET *SHIGELLA BOYDII* 6. LEUR VALEUR POUR LE DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL

par M^{mes} S. RUBINSTEN et D. PIÉCHAUD.

(C.N.R.S. et Service de Microbie générale de l'Institut Pasteur.)

En France il est rare à l'heure actuelle d'isoler le bacille de Sonne classique ayant la propriété de fermenter le lactose tardivement ; les souches que nous avons étaient, ces dernières années, lactose négatives.

On conçoit qu'il y ait là une difficulté nouvelle pour le diagnostic différentiel entre *Shigella sonnei* et *Shigella boydii* 6.

Comme nous l'avons déjà dit [1] l'étude sérologique apporte une aide sérieuse quand ces bacilles de Sonne sont en phase I ; on peut alors les classer dans le groupe D (Ewing [2]) les séparant ainsi de *Shigella boydii* 6. Mais si la souche à étudier est en phase II, seule l'étude biochimique oriente la classification.

Nous avons recherché d'autres tests pour appuyer notre diagnostic : étude des sensibilités aux antibiotiques et aux sulfamides ; réaction à l'acide phényl-propionique [3].

La sensibilité aux antibiotiques. — Nous avons choisi 20 souches de *Shigella sonnei*, 7 isolées en France, 13 dans différentes colonies ; parmi ces souches, 8 sont d'isolement récent, 12 souches classiques fermentent le lactose en deux à quatre jours, 6 sont lactose négatives, 2 sont des mutants fermentant le lactose rapidement [4].

Les 5 souches de *Shigella boydii* sont des souches test, 3 du Dysentery Reference Laboratory, Oxford : D 27, M 279, N.C.T.C. 8211, 1 de la Brown University, U.S.A. ; 1 de la collection de Weil Lederle Laboratories : 75-25-4.

La sensibilité aux antibiotiques a été recherchée vis-à-vis du chloramphénicol, de la streptomycine, l'auréomycine et la terramycine selon les techniques proposées par Chabbert [5], en utilisant sur boîte de Petri des disques imbibés d'antibiotique, et par la méthode de titrage en tube [6].

La sensibilité aux 4 sulfamides a été titrée sur boîte de Petri avec des disques imbibés [7] :

- A. — *p*.amino-phényl-sulfamide.
- B. — *p*.amino-phényl-sulfamide thiazole.
- C. — *p*.amino-phényl-sulfamide méthyl-thio-diazole.
- D. — *p*.amino-phényl-sulfamide pyrimidine.

Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau. Comme on le voit dans ce tableau, nos souches de *Shigella sonnei* sont très sensibles au chloramphénicol et à la streptomycine, sensibles à la terramycine, et à la limite de la sensibilité pour l'auréomycine.

ANTIBIOTIQUES	Shigella sonnei			Shigella boydii 6		
	S	L	R	S	L	R
Auréomycine	5 %	95 %		40 %	60 %	
Chloramphénicol	100 %			60 %	40 %	
Streptomycine	100 %			20 %	60 %	20 %
Terramycine	100 %			60 %	40 %	

SULFAMIDES	Shigella sonnei			Shigella boydii 6		
	T	S	M	T	S	M
A	5 %	65 %	30 %	20 %	40 %	40 %
B	70 %	30 %		100 %		
C	100 %			100 %		
D	20 %	80 %		20 %	80 %	

S=sensible; L=limite; R=résistante; T=très sensible; M=sensibilité moyenne.

Des 5 souches de *Shigella boydii* 6, toutes sont sensibles aux 4 antibiotiques, sauf une qui est résistante à la streptomycine.

Toutes les souches, *Shigella sonnei* ou *boydii* 6, sont extrêmement

sensibles aux sulfamides ; des constatations inverses ont été faites par certains auteurs dans d'autres parties du monde, notamment au Japon [8].

On voit donc que, malgré des différences de sensibilité, aucun test n'est assez net pour permettre une classification de nos deux groupes de souches.

RÉACTION A L'ACIDE PHÉNYL-PROPIONIQUE. — Utilisant les techniques proposées par Giuseppe d'Alessandro [3], nous avons étudié un nombre important de bacilles dysentériques et réuni quelques faits qui nous semblent intéressants.

1° On n'a pas intérêt à pratiquer des réactions en tubes dans la gélose en culot. La coloration de l'acide phényl-propionique ne se produit que dans la partie aérée de la gélose.

2° En bouillon la réaction est assez instable, la température de l'étuve la favorise. Deux séries de bouillons ensemencées avec les mêmes souches ne se comportent pas de la même façon à 37° ou à la température du laboratoire (à laquelle la réaction est assez souvent négative). De plus la réaction est moins sensible en bouillon qu'en gélose.

A notre avis la technique de choix est celle qui se fait sur gélose en boîte de Petri. On coule de la gélose nutritive additionnée d'acide phényl-propionique à 1/5 000 en boîte de Petri (25 à 30 m^l de milieu). Sur une boîte on peut facilement disposer 7 souches, sous forme de petits disques de 5 à 7 mm de diamètre faits avec l'anse.

La boîte est gardée vingt-quatre heures à l'étuve, puis sur la table du laboratoire. L'apparition de la coloration rose-chamois se situe entre le deuxième et le troisième jour après l'ensemencement. L'intensité de la coloration, comme sa date d'apparition, varie d'une souche à l'autre dans une même espèce. La coloration, après avoir été intense, diminue pour disparaître en huit à dix jours. Cette technique très simple permet en outre l'étude simultanée de nombreuses souches avec peu de matériel. Elle donne des résultats constants pour certains groupes de *Shigella*. Nous avons étudié 53 souches de bacille de Sonne comprenant des germes de toutes origines — les uns de collection, les autres fraîchement isolés — des souches classiques, des souches ne fermentant pas le lactose et des mutants le fermentant rapidement.

Toutes ces souches sans exception donnaient une réaction positive en deux à trois jours. Il est à noter que les souches récemment isolées sont plus vite et plus fortement positives que les souches de collection. Comme d'Alessandro l'avait signalé dans un mémoire original à propos de toutes les souches de *Shigella boydii* étudiées, nos 5 souches *Shigella boydii* 6 ont une réaction négative à l'acide phényl-propionique.

La positivité constante de la réaction pour *Shigella sonnei*, en opposition avec la réaction négative de *Shigella boydii* 6, est un argument de grand intérêt pour le diagnostic rapide entre ces deux espèces.

Si la sérologie reste un argument majeur pour le diagnostic d'un bacille de Sonne en phase I, il est impossible de reconnaître par les techniques dont nous disposons Sonne en phase II de Boyd 6, difficulté renforcée s'il s'agit d'une *Shigella sonnei* qui ne vire pas le lactose. Mais on dispose d'arguments biochimiques importants permettant un diagnostic précoce.

Shigella sonnei associe toujours à la fermentation du rhamnose une réaction positive à l'acide phényl-propionique, tandis que le xylose est ou n'est pas utilisé. *Shigella boydii* 6 est rhamnose —, xylose+ et ne donne jamais de réaction colorée à l'acide phényl-propionique.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] S. RUBINSTEN et D. PIÉCHAUD. *Ces Annales*, 1952, **82**, 770.
- [2] W. EWING. *J. Bact.*, 1949, **57**, 625.
- [3] G. D'ALESSANDRO et R. COMES. *Boll. Istitt. sieroter. milan.*, 1952, **31**, 291.
- [4] S. RUBINSTEN et P. THIBAUT. *Ces Annales*, 1952, **82**, 104.
- [5] Y. CHABBERT. *Ann. Biol. clin.*, 1951, **9**, 544.
- [6] Y. CHABBERT et B. SUREAU. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1142.
- [7] Y. CHABBERT, F. BOYER et M. DECHAVASSINE. *Ces Annales*, 1953, **85**, 56.
- [8] I. TATENO et H. TAKAYAMA. *Japan J. exp. Med.*, 1951, **21**, 285.

APPLICATION DE LA MÉTHODE DE FEULGEN ROSSENBECK AUX CULTURES SUR LAMES GÉLOSÉES

par PHILIPPE-JACQUES LUTERAAN et CHARLES GUYOTJEANNIN.

La culture sur lame permet d'étudier la morphogenèse et la disposition prise au cours du développement. Malheureusement, on ne peut, sur de telles préparations, appliquer la méthode habituelle de Feulgen pour révéler les noyaux, puisque la gélose se décolle alors des lames. Nous avons donc cherché une modification de la méthode évitant cet inconvénient et nous avons mis au point le procédé suivant.

1° Les lames, après culture, sont fixées, à l'état frais, par le chloroforme, puis mises à sécher à la température du laboratoire.

2° On verse alors à leur surface un mélange de :

Acide chlorhydrique fumant	20 à 50 cm ³
Alcool à 95°	Q.S. 100 cm ³

(on prendra le mélange à 20 p. 100 d'acide chlorhydrique quand on voudra respecter la structure nucléaire et celui à 50 p. 100 lorsqu'on se contentera de la numération des masses nucléaires qui est ainsi plus facile).

Au bout de cinq minutes, on verse l'excès et on laisse sécher les lames à la température du laboratoire.

3° Les lames sont replacées horizontalement et recouvertes d'alcool, puis on y verse quelques gouttes de réactif de Schiff préparé ainsi :

La fuch sine basique, 0,5 g, est soigneusement pulvérisée et versée dans 100 cm³ d'eau distillée bouillante ; on laisse bouillir quelques minutes sans cesser d'agiter ; la solution est filtrée ; sa température est de 70-80° C et on y ajoute aussitôt 10 cm³ d'acide chlorhydrique normal en agitant ; quand la solution est froide, on ajoute 0,5 g ou

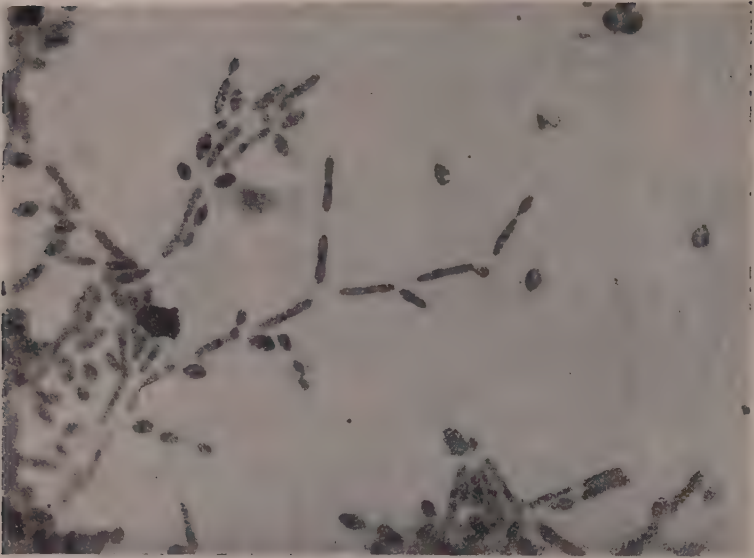


FIG. 1. — *Saccharomyces acidifaciens* (Nickerson). Culture sur lame, résultats habituels de notre méthode, noyaux d'éléments pseudo-mycéliens. (Gross. : $\times 1\ 000$.)

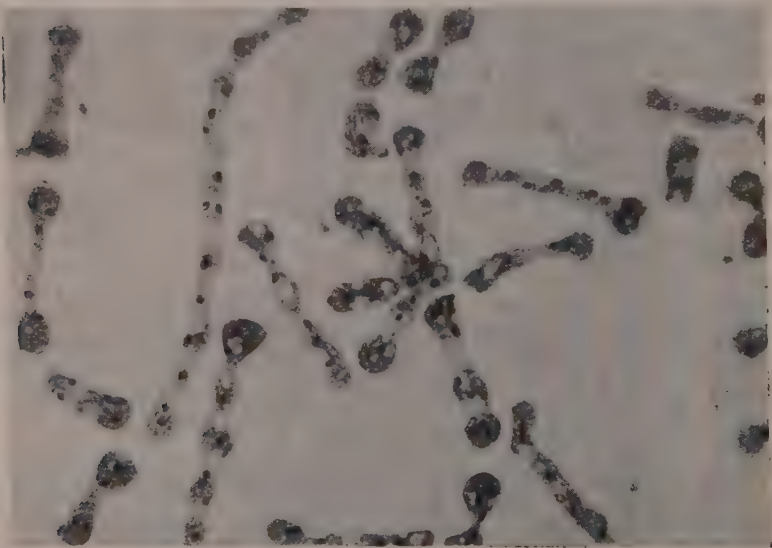


FIG. 2. — *Geotrichum candidum* (ancien *Oidium lactis*). Culture sur lame. (Gross. : $\times 1\ 250$.) Chaque élément renferme plusieurs noyaux et la division des noyaux précède la résolution en arthrospores qui, jeunes, renferment le plus souvent deux noyaux. Ces faits ont été vérifiés avec des souches de provenances diverses.

1 g au plus, de métabisulfite de sodium en agitant ; le reste sans changement par rapport aux techniques habituelles. Cette façon de préparer le réactif de Schiff nous a paru être la meilleure en vue de son application à la méthode de Feulgen et nous n'avons trouvé aucune différence entre des fuchsines de diverses provenances.

On laisse le réactif agir vingt minutes ou plus et on lave la lame à l'alcool.

4° La lame est remplacée horizontalement et inondée d'alcool contenant quelques gouttes d'une solution aqueuse de vert de méthyle à 1 p. 100 ; on laisse quelques minutes ou plus ; on lave à l'alcool.

La lame peut être conservée indéfiniment à l'air sans crainte de voir le réactif de Schiff s'oxyder. C'est d'ailleurs dans ce but que nous avons choisi le vert de méthyle, ayant constaté qu'il bloquait l'oxydation du réactif de Schiff, tout en tendant à se décolorer à son contact.

Les bons résultats sont constants avec ce procédé et avec de l'éthanol suffisamment pur comme intermédiaire.

Tous les noyaux, sans exception, chez des levures ou champignons filamenteux, sont mis en évidence en rouge violacé sur fond vert pâle ou plus foncé si on a prolongé le 4° temps.

D'autres techniques, elles classiques, donnent probablement de meilleurs résultats en vue de l'étude de la structure du noyau ; mais aucune ne nous a paru mettre mieux le noyau en évidence ; enfin son principal avantage est de s'appliquer, seule jusqu'ici, aux cultures sur lame et de permettre l'étude des noyaux sur les champignons développés *in situ*, comme le montrent les clichés. Sur l'un d'eux on voit clairement que *Geotrichum candidum* est constitué d'éléments plurinucléés, ce qui rapproche cet organisme des Siphomycètes.

BIBLIOGRAPHIE

- H. J. CONN. *Biological stains*. Geneva, N. Y., 1946, 5^e éd.
B. DELAPORTE. *Adv. in Genetics*, 1950, 3, 1.
R. FEULGEN et H. ROSSENBECK. *Zeitschr. physiol. Chemie*, 1924, 135, 203.
R. FEULGEN et K. VOIT. *Zeitschr. physiol. Chemie*, 1924, 135, 249 et 1924, 136, 57.
A. GAGNIEU et G. LAISNÉ. *L'observation des chromosomes*. Sedes, Paris.
Ph. J. LUTERAAN et Ch. GUYOTJEANNIN. *Revue Mycologie*, 1952, 17, 158.
O. WINGE. *C. R. Lab. Carlsberg, Série Physiol.*, 1935, 34, 77.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Signification et interprétation des numérations sur plaques des germes telluriques, par D. LAVERGNE.

Bactéries pathogènes ou saprophytes transformant le glucose en acide gluconique, « *Bacterium anitratum*, B5W, Mora-

xella lwoffii var. **glucidolytica**, *Neisseria winogradskyi* », par P. VILLECOURT et G. JACOBELLI.

Physiologie des Actinomycètes aérobies pathogènes. I. Expériences préliminaires, par F. MARIAT.

LIVRES REÇUS

Houben-Weyl. — *Methoden der organischen Chemie*. 4^e édition complètement mise à jour sous la direction de E. Müller, avec la collaboration de O. Bayer, H. Meerwein et K. Ziegler. Tome VIII. Combinaisons oxygénées, III. 775 pages. Georg Thieme, édit., Stuttgart. — Prix : 98 D.M.

Une nouvelle édition du Traité classique de Houben-Weyl : « Die Methoden der organischen Chemie », était attendue avec impatience par tous les laboratoires de Chimie Organique. La 3^e édition, épuisée depuis fort longtemps, comportait 4 volumes et avait été publiée entre 1925 et 1941. La 4^e édition comporte 14 volumes à paraître en quatre ans. Les auteurs des différents chapitres ont été choisis tant parmi les spécialistes de l'Université que parmi ceux de l'industrie. Cette collaboration s'est avérée particulièrement féconde, l'industrie chimique ayant mis à la disposition des rédacteurs une documentation souvent difficilement accessible et particulièrement fournie dans le domaine des brevets. Le Comité de Rédaction, qui comprend, sous la direction de E. Müller, les professeurs Otto Bayer, Meerwein et Ziegler, concrétise cette collaboration et est un sûr garant du sérieux de l'entreprise.

Le premier volume paru, le tome VIII, traite des peroxydes, des dérivés de l'acide carbonique, des acides organiques, de leurs esters et de leurs dérivés azotés. Dans ce dernier chapitre ont été groupées une série de fonctions — nitriles, amides, imino-éthers — auparavant dispersées dont le lien avec la fonction acide est évident. Le soin apporté à la bibliographie, l'introduction de tableaux schématisant les différentes réactions des groupements ou des composés étudiés, tels les schémas de réaction du phosgène ou de la dicyandiamide, la place importante accordée à des corps tel que la cyanamide et ses dérivés, trop souvent négligés dans les Traités classiques, font de cet ouvrage impeccablement présenté, un instrument de travail extrêmement précieux qui fait augurer favorablement des volumes à venir.

On ne peut que féliciter le Comité de Rédaction de nous offrir un ouvrage qui, une fois complet, constituera une Somme de la Chimie Organique pratique.

P. K.

G. E. W. Wolstenholme. — *Ciba Foundation. Colloquia on Endocrinology*, t. VI : Hormonal factors in carbohydrate metabolism, 1 vol. 350 p. Prix : 35 sh. ; t. VII : Synthesis and metabolism of adrenocortical steroids, 1 vol. 297 p. J. et A. Churchill, édit., Londres, 1953. Prix : 30 sh.

Les questions discutées dans ces deux volumes, et en particulier celle des stéroïdes surrénaliens, sont parmi celles qui ont fait les plus

rapides progrès au cours de ces dernières années. De nombreuses communications, suivies d'importantes discussions, ont été présentées à chacun de ces Colloques. On ne peut qu'énumérer les principales sections de chacun des volumes.

Volume VI : I^{re} partie : Les enzymes impliqués dans le métabolisme des glucides. II^e partie : Le contrôle du métabolisme des glucides, des protéines et des graisses. III. Influence du cortex surrénalien sur le métabolisme des glucides. IV. Contrôle hormonal de la réserve de glycogène. V. Influence de l'insuline sur le métabolisme des glucides. VI. Les hormones sexuelles, la grossesse et le métabolisme des glucides.

Volume VII : I^{re} partie : Synthèse des stéroïdes surrénaliens et autres (cholestérol, lanostérol, ergostérol, 11-kétostéroïdes, différentes hydrocorticoïdes, action des rayons X sur certains stéroïdes, etc.). II^e partie : Métabolisme des stéroïdes surrénaliens (biogenèse des hormones corticales, enzymes impliqués dans la synthèse et la dégradation des hormones corticales, synthèse des stéroïdes *in vitro*, les stéroïdes chez les différentes espèces animales, leur métabolisme chez l'animal et chez l'homme, etc.).

H. T.

D. B. Blacklock et T. Southwell. — *A Guide to human Parasitology.* 5^e édition, revue par T. H. Davey. 1 vol. 228 p., 120 fig., H. K. Lewis et C^o, édit., Londres, 1953. Prix : 25 sh.

Ce volume représente la 5^e édition de cet ouvrage, la première remontant à 1931, la dernière aux premiers mois de 1940, avant que la guerre se soit étendue aux pays tropicaux et ait ramené l'attention sur les parasites qui causent les diverses infections de l'homme. Tous les récents progrès qu'a faits l'étude des maladies parasitaires au cours de ces dernières années (cycles vitaux, modes de transmission, vecteurs, méthodes de diagnostic, etc.) sont passés en revue dans cette nouvelle édition. On y a inclus en outre certains protozoaires, helminthes ou autres parasites, qui n'avaient pas été étudiés dans les éditions précédentes. Un paragraphe concernant la prévention de chacune des infections a été également ajouté. La simplicité et la concision des précédentes éditions ont été conservées et les nouvelles méthodes de diagnostic qui sont décrites ont été choisies parmi celles qui n'exigent pas un laboratoire spécialement équipé. Les très nombreuses figures et l'index alphabétique donnent beaucoup de clarté à l'ouvrage.

H. T.

F. Cusset. — *Tables complètes de conversion des mesures américaines, britanniques et métriques. Etude, définitions et conditions d'emploi.* Nouvelle édition, revue et complétée. 1 vol. 191 p. Blondel la Rougery, édit., Paris, 1953. Prix : 640 fr.

Voici un opuscule qui rendra de grands services, car il permet la conversion instantanée de toutes les mesures anglaises, américaines et métriques. L'importance croissante de la technologie américaine impose malheureusement avec une fréquence croissante le calcul en mesures non métriques ou la conversion en mesures métriques d'unités anglo-

saxonnes. Si regrettable que soit cet état de chose du point de vue de la simple logique, les techniciens et les gens de laboratoire sont souvent contraints de s'y plier. Cet ouvrage, qui comporte la conversion de plus de 200 000 chiffres concernant toutes les mesures anglaises, américaines et métriques, présente l'avantage énorme d'une consultation facile et claire. C'est par excellence l'instrument de travail de tous ceux qui ont, de près ou de loin, affaire avec les conversions toujours compliquées des mesures anglaises et américaines. En dehors des tableaux de conversion, l'ouvrage contient des études et définitions sur toutes les mesures sans aucune exception (monnaie, textile, mécanique, métallurgie, etc.). Il est complété par un index alphabétique, extrêmement complet, de toutes les mesures et matières citées dans le texte.

P. L.

Sir Henry Hallett Dale. — *Adventures in Physiology with excursions into autopharmacology.* 1 vol., 232 p. Pergamon Press Ltd. édit., Londres, 1952. Prix : 6 livres 6 sh.

Les éditions Pergamon Press ont pris l'initiative de demander à Sir Henry Dale de procéder lui-même à un choix de ses travaux les plus importants et d'en autoriser la publication en un volume spécial, afin de les rendre plus accessibles à tous ceux qui, après lui, ont continué à étudier les mêmes sujets. On trouvera donc réunis ici 30 articles publiés par Sir Henry Dale de 1906 à 1938, et qui concernent surtout l'action spécifique de l'adrénaline, de l'acétylcholine, la transmission chimique de l'influx nerveux, l'action de l'histamine, sa répartition dans l'organisme animal, les réactions locales et générales qu'elle provoque et, d'une façon générale, son rôle dans les phénomènes d'immunité et d'anaphylaxie, les propriétés physiologiques de l'ergot de seigle et de l'ergotoxine, etc. L'ensemble de ces travaux couvre les domaines de la physiologie, de la pharmacologie et de la pathologie expérimentale. Une importante introduction et quelques commentaires rédigés par Sir Henry Dale complètent les données relatées dans les différents articles reproduits en décrivant les progrès qui ont été faits depuis leur parution. On trouvera à la fin de l'ouvrage une bibliographie complète des travaux de l'auteur de 1899 à la date de la parution du volume, bibliographie qui ne comprend pas moins de 253 titres. L'intérêt des sujets traités et la personnalité de l'auteur assureront à ce bel ouvrage le succès qu'il mérite.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.